

Aus dem Institut für Virologie
Des Medizinischen Zentrums für Mikrobiologie und Hygiene
Der Philipps-Universität Marburg
Leiter Herr Prof. Dr. H.-D. Klenk

Der Tumorsuppressor p53 und Adenoviren als Transkriptionsmodulatoren

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
von

Kristina Löhr
aus Wolfsburg

Marburg an der Lahn
2003

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zellzyklus und Transkriptionsregulation	1
1.2	Apoptose, der programmierte Zelltod	2
1.3	Das Tumorsuppressorprotein p53	3
1.3.1	Struktur von p53	3
1.3.2	Negative und positive Kontrolle der p53-Aktivität	4
1.3.3	Funktion von p53	6
1.3.4	Transkriptionsrepression durch p53	8
1.4	p21/waf1/CDKN1A, ein Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen	9
1.5	p73 – ein p53-Homolog	10
1.6	Adenoviren	12
1.6.1	Genomaufbau der Adenoviren	12
1.6.2	Phasen der Adenovirusreplikation	14
1.7	Expressionsanalyse mit cDNA-Mikroarrays	17
1.8	Aufgabenstellung:	19
1.8.1	Negative Transkriptionsregulation durch p53	19
1.8.2	Beeinflussung der zellulären Transkription durch Infektion mit dem wildtypischen Adenovirus	20
2	MATERIAL	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Medien	23
2.3	Puffer und Lösungen	23
2.4	Antikörper	26
2.5	Kits	27
2.6	Plasmide & Vektoren	27
2.7	Oligonukleotide	28
2.8	Bakterien	29
2.9	Viren	29
2.10	Eukaryontenzellen	30
3	METHODEN	31
3.1	Zellbiologische Methoden	31
3.1.1	Zellkulturtechnik	31
3.1.2	Herstellung eines Virusstocks	32

3.1.3	Titerbestimmung	33
3.1.4	Transduktion von Eukaryontenzellen	33
3.1.5	Liposomen-vermittelte Transfektion von Eukaryontenzellen	34
3.2	Proteinchemische & Immunologische Methoden	35
3.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz	35
3.2.2	Immunoblot	36
3.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford	38
3.3	Assays	38
3.3.1	Luziferase-Assay	38
3.3.2	RT-PCR-Assay	39
3.4	Arbeiten mit Plasmid-DNA	41
3.4.1	Transformation von <i>E.coli</i>	41
3.4.2	DNA-Isolation und Quantifizierung	42
3.4.3	Fällung von DNA	44
3.4.4	Restriktionsverdau von DNA	45
3.4.5	Polymerase-Kettenreaktion	45
3.4.6	Mutagenese	47
3.4.7	Sequenzierung von DNA	50
3.5	Elektrophoretische Methoden	52
3.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	52
3.5.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
3.5.3	Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenziergel	54
3.6	cDNA Microarrays	55
3.6.1	Arraydesign	56
3.6.2	Probenaufbereitung	56
3.6.3	Hybridisierung	57
3.6.4	Messung, Auswertung und Normalisierung	58
4	ERGEBNISSE	59
4.1	Negative Transkriptionsregulation durch p53	59
4.1.1	Das adenovirale Protein E1B-19kDa ist in der Lage, die p53-vermittelte Apoptose zu inhibieren, ohne die Repression von <i>Survivin</i> und <i>Stathmin</i> aufzuheben	59
4.1.2	Das Peptid Z-VAD ist ebenfalls fähig, die p53-induzierte Apoptose zu inhibieren, ohne die Repression von <i>Survivin</i> und <i>Stathmin</i> zu unterbinden	65
4.1.3	Die Repression der Gene <i>Survivin</i> und <i>Stathmin</i> durch p53 oder p73 wird auf indirektem Wege hervorgerufen	68
4.1.4	Die Reprimierbarkeit des <i>Survivin</i> -Promoters wird nicht aufgehoben durch Deletion der putativen p53-Bindungsstelle	72

4.2	Beeinflussung der zellulären Transkription durch Infektion mit wildtypischem Adenovirus	82
4.2.1	Unter 4600 untersuchten Genen werden nur 14 mit mehr als dreifach differentieller Regulation detektiert	82
4.2.2	Die differentielle Expression der im Array identifizierten Gene konnte via RT-PCR verifiziert werden	84
4.2.3	Die Repression von <i>Myc</i> und <i>TOB1</i> ist abhängig von der Anwesenheit sich replizierender Viren	85
4.2.4	Zur Repression von <i>Myc</i> und <i>TOB1</i> sind die Proteine E1B-55kDa, E4orf3 und E4orf6 nicht nötig, E1B-55kDa und E4orf6 verstärken jedoch die Repression	87
4.2.5	Das <i>Myc</i> -Protein wird durch die Infektion mit dl309 stabilisiert	89
4.2.6	Zur Stabilisierung von <i>Myc</i> sind die Proteine E1B-55kDa, E4orf3 und E4orf6 nicht nötig	89
4.2.7	Transient exprimiertes E1A vermag <i>Myc</i> zu stabilisieren	90
4.2.8	Die Replikationsfähigkeit des Virus ist nicht notwendig für die Stabilisierung von <i>Myc</i>	91
4.2.9	Die Replikationsfähigkeit des Adenovirus dl309 wird durch gleichzeitige Überexpression von <i>Myc</i> vermindert	92
4.2.10	Die Überexpression von <i>Myc</i> hat keinen apoptose-induzierenden Effekt in HeLa-Zellen	94
4.2.11	Die Expression von E2A ist auf Protein- und mRNA-Level in Gegenwart von Ad- <i>Myc</i> unverändert	95
4.2.12	Die Bildung der Replikationszentren von dl309 wird durch die Überexpression von <i>Myc</i> inhibiert	96
5	DISKUSSION	99
6	ZUSAMMENFASSUNG	109
7	ABSTRACT	111
8	ABKÜRZUNGEN	113
9	LITERATUR	115
10	DANKE	132

1 Einleitung

1.1 Zellzyklus und Transkriptionsregulation

Zur Aufrechterhaltung eines Organismus oder eines Zellverbandes ist eine kontinuierliche Erneuerung in Form von Zellteilung notwendig. Diese muss in kontrollierter Form ablaufen, um das Bestehen des Organismus und die Gewebeerneuerung, wie z.B. die Wundheilung, zu sichern. Auf der anderen Seite müssen die Effekte von schädigenden Einflüssen auf das Genom erkannt und behoben werden können, um eine Ansammlung von Erbgutveränderungen in der Zelle zu verhindern.

Die Zellteilung unterliegt strengen Regulationsmechanismen und lässt sich in verschiedene Phasen (Zellzyklus) unterteilen. Man unterscheidet zwischen G_0/G_1 -, S-, G_2 - und M-Phasen. Unter G_0 versteht man den Zustand einer ruhenden, nicht proliferierenden Zelle. Die Zelle weist in diesem Zustand einen DNA-Gehalt von $2n$ auf. Bei proliferierenden Zellen hingegen schließt sich an die G_1 -Phase die S-Phase an. Dabei wird neue DNA synthetisiert, so dass der DNA-Gehalt am Ende dieser Phase $4n$ beträgt. Den Zeitabschnitt zwischen dem Ende der DNA-Synthese und der einsetzenden Mitose nennt man G_2 -Phase. Die nun folgende Teilung (Mitose) der Zelle in zwei Tochterzellen wird als M-Phase bezeichnet. Hieran schließt sich wiederum die G_0 -, bzw. die G_1 -Phase an.

Der Übergang zwischen der G_1 - und der S-Phase stellt einen bevorzugten Angriffspunkt von Onkoproteinen und Tumorsuppressoren dar. Der Übergang der Zelle von der G_1 - in die S-Phase kann sowohl von p53 als auch von den Mitgliedern der Rb-Familie (p107, p130) unterbunden werden (Funk und Galloway, 1998; Levine, 1997). Während p53 selbst als Transkriptionsfaktor wirkt, hemmen die Proteine der Rb-Familie die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und beeinflussen so indirekt die Transkription. Die Bindung von Rb an E2F verhindert den Übergang der Zelle in die S-Phase. Diese Wechselwirkung mit E2F kann jedoch durch Phosphorylierung von Rb durch zyklinabhängige Kinasen unterbrochen werden, welche dann den Übergang in die S-Phase ermöglichen.

An dieser Stelle greifen auch verschiedene virale Proteine in die Regulation des Zellzyklus ein. Das adenovirale E1A-Protein ist zum Beispiel in der Lage, an Rb zu

binden und somit dessen Wechselwirkung mit E2F auszuschalten (Sakamuro et al., 1997). E2F wird also aktiviert und die Zelle schreitet im Zellzyklus voran (Brehm et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998).

Eine andere Strategie zur Modulation des Zellzyklus haben die Papillomaviren: das Protein E6 von HPV ist in der Lage, an p53 zu binden und macht es somit unfähig, seiner normalen Aufgabe als Transkriptionsfaktor nachzukommen. E7 hingegen bindet an Rb mit den oben beschriebenen Auswirkungen auf E2F (Scheffner et al., 1993; Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990).

1.2 Apoptose, der programmierte Zelltod

Nekrose (metabolischer Zelltod) ist ein pathologischer Prozess, welcher bei ernsten physikalischen oder chemischen Verletzungen der Zelle auftritt. Die Nekrose ist begleitet von frühem Verlust der Membranintegrität. Nekrotische Prozesse entstehen *in vivo*, z.B. durch Durchblutungsstörungen oder metabolische Mangelsituationen und gehen häufig mit inflammatorischen Begleitreaktionen einher.

Unter Apoptose (programmierter Zelltod) hingegen versteht man einen physiologischen Prozess, durch den unerwünschte oder nicht mehr funktionsfähige Zellen über ein zelleigenes Programm aus dem Organismus entfernt werden. Die Plasmamembran bleibt bei apoptotischen Zellen, im Gegensatz zu nekrotischen, sehr lange intakt, und erst zu einem späteren Zeitpunkt kommt es durch eine sogenannte sekundäre Nekrose zum Verlust der Membranintegrität.

Charakteristische morphologische und biochemische Merkmale apoptotischer Zellen sind die Aggregation des Chromatins und die Aufteilung des Zytoplasmas und des Zellkernes in membrangebundene Vesikel (*apoptotic bodies*), welche Mitochondrien, Ribosomen und Zellbestandteile enthalten. *In vivo* erfolgt eine rasche Phagozytierung dieser Einschlusskörper durch Makrophagen oder benachbarte Epithelzellen. Diese schnelle Beseitigung apoptotischer Zellen aus dem Organismus ist der Grund dafür, dass es im Laufe der Apoptose normalerweise nicht zu einer inflammatorischen Reaktion kommt. (Übersicht bei (Hengartner, 2000))

Apoptose ist unter anderem verantwortlich für die normalen Gewebserneuerung, den Zelltod in der Entwicklung und die Beseitigung von Zellen, welche durch Hypoxie, DNA-Schäden oder virale Infekte geschädigt werden.

1.3 Das Tumorsuppressorprotein p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 nimmt eine Schlüsselposition bei der Regulation von Zellteilung und Apoptose ein. p53 schützt die Zelle vor einer Anhäufung von Mutationen und unterdrückt die Zelltransformation nach der Aktivierung von Onkogenen oder dem Verlust von anderen Tumorsuppressoren. Die Wichtigkeit von p53 als Tumorsuppressorprotein wird unterstrichen durch die Tatsache, dass sich in mehr als 50% aller humanen Tumoren eine p53-Mutation findet (Lane, 1992; Levine, 1997; Vogelstein et al., 2000).

1.3.1 Struktur von p53

p53 ist ein 393 Aminosäuren umfassendes Protein und kann in mindestens drei Domänen unterteilt werden (Levine, 1997): im N-terminalen Bereich befindet sich die Transaktivierungsdomäne, zu der die Aminosäuren 1 bis 43 gehören. Im mittleren Teil des Moleküles liegt die DNA-bindende Domäne (Aminosäuren 100 bis 300). Am carboxy-terminalen Ende enthalten die Aminosäuren 300 bis 393 die Oligomerisierungsdomäne (Ko und Prives, 1996).

Die Transaktivierungsdomäne bindet die für die Initiation der Transkription wichtigen Faktoren, wie z.B. p300, das TATA-Box *binding protein* (TBP) (Chen et al., 1995) oder TFIID (Horikoshi et al., 1995). Die Aminosäuren L22 und W23 sind dabei von entscheidender Bedeutung für die Aktivität der transaktivierenden Domäne (Lin et al., 1995). Ohne sie können diese für die Transkriptionsinitiation wichtigen Faktoren nicht gebunden werden.

Diese Transkriptionsinitiationsfaktoren werden nach Bindung von p53 an die DNA durch die Transaktivierungsdomäne an den Promoter herantitriert. Hierdurch wird die Anlagerung der RNA-Polymerase II ermöglicht und das p53-responsive Gen entsprechend verstärkt exprimiert.

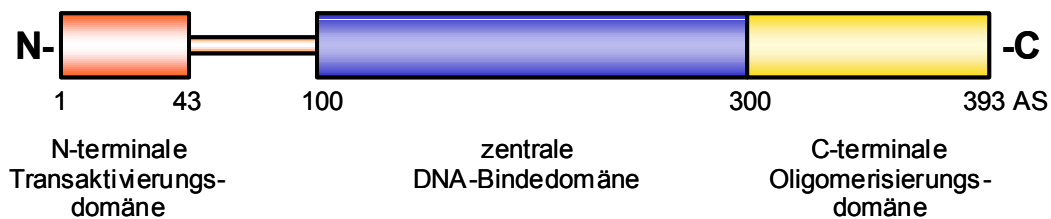


Abbildung 1.1: Struktur des Tumorsuppressorproteins 53. p53 ist ein 53kDa großes Protein, bei dem mindestens drei Domänen unterschieden werden können: die N-terminale transaktivierende, die zentrale DNA-bindende und die carboxyterminale Oligomerisierungsdomäne.

Mit Hilfe der zentralen DNA-Bindedomäne erfolgt die Bindung der p53-Moleküle an spezifische Sequenzelemente der Promoter-DNA. Die meisten der in humanen Tumoren vorkommenden p53-Mutationen befinden sich im Bereich dieser zentralen DNA-bindenden Domäne (Hollstein et al., 1994) und verhindern so eine Bindung des mutierten p53 Moleküls an die entsprechenden Promotersequenzen.

Die carboxyterminale Oligomerisierungsdomäne vermittelt die Tetramerisierung von p53 (Bildung des Dimers eines Dimers (Jeffrey et al., 1995)). Diese Domäne übt zudem einen regulatorischen Effekt aus, indem sie sich zurückfalten und somit die zentrale DNA-Bindedomäne verdecken kann.

1.3.2 Negative und positive Kontrolle der p53-Aktivität

Da es sich bei p53 um einen Inhibitor des Zellwachstums handelt, ist es von entscheidender Bedeutung, die p53-Menge- und Aktivität zu Zeiten des normalen Wachstums streng zu kontrollieren. Der wichtigste Mechanismus zur Regulierung der p53-Funktion ist der negative Rückkopplungsmechanismus zwischen p53 und seinem Antagonisten mdm2: p53 induziert die Expression von mdm2. Mdm2 ist eine E3-Ligase, die p53 durch Übertragung von Ubiquitinresten dem proteasomalen Abbau zuführt (Vousden, 2000; Vousden und Woude, 2000), somit induziert p53 durch seine transkriptionelle Aktivität die Expression seines eigenen Antagonisten.

Die intrazellulären Mengen von p53 sind im Normalfall relativ gering, was auf die kurze Halbwertszeit des Proteins (~20 Minuten) durch den mdm2-vermittelten Abbau zurückzuführen ist. p53 kann jedoch durch verschiedene Arten von genotoxischem

Stress sowohl stabilisiert (Perry et al., 1993) als auch aktiviert werden. Es können diesbezüglich mindestens drei verschiedene Mechanismen genannt werden (siehe Abbildung 1.3):

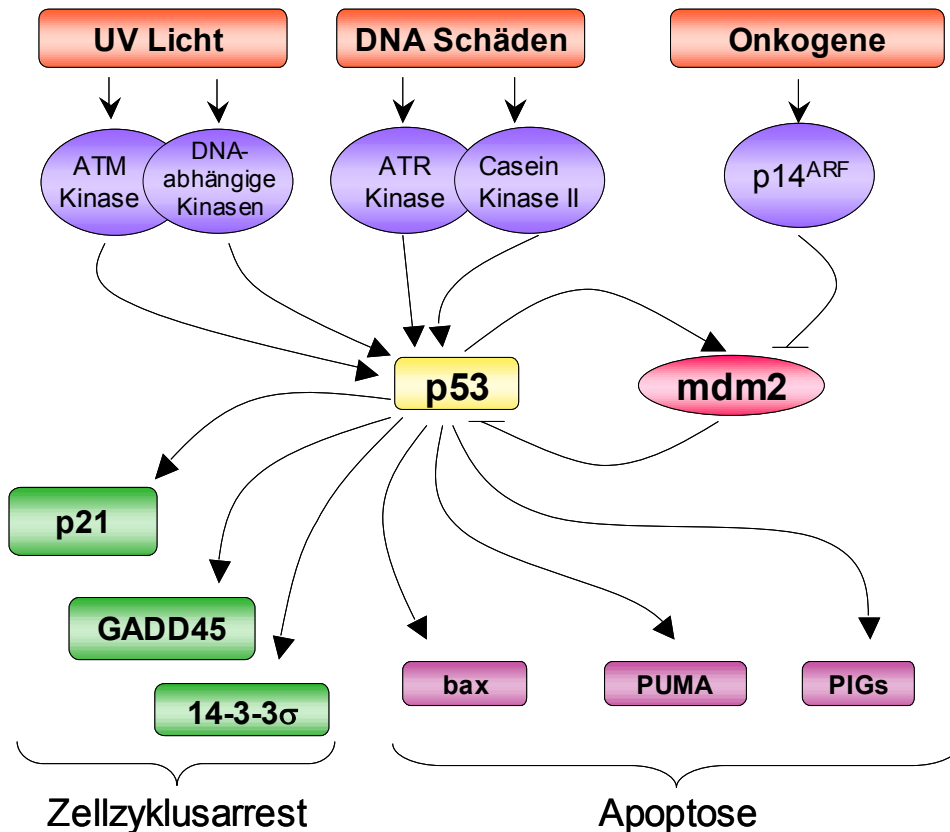


Abbildung 1.2: Das p53-Netzwerk. p53 ist Gegenstand einer sehr stringenten Regulierung. DNA-Schäden oder die Einwirkung von zellulären Onkogenen führen zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53, welches seinerseits einen Zellzyklusarrest bewirkt. Je nach Schwere des vorliegenden Schadens wird entweder die DNA repariert oder die Apoptose eingeleitet. Beides wird durch p53 via Transkriptionsregulation anderer Gene vermittelt. (Graphik angelehnt an (Vogelstein et al., 2000))

Ein Weg zur Stabilisierung von p53 führt über die Aktivierung von ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und anderen DNA-abhängigen Kinasen. Diese werden durch DNA-Schäden, wie sie durch UV- oder γ -Strahlung hervorgerufen werden können, aktiviert, was zu kovalenten Modifikationen von p53 führt (Lakin und Jackson, 1999). Zu diesen gehören Phosphorylierungen im Bereich der transaktivierenden Domäne und Acetylierungen sowie Phosphorylierungen in der carboxyterminalen Region.

Chemotherapeutika, wie Cis-Platin oder Doxorubicin, bewirken eine erhöhte Expression von Enzymen wie ATR (*ataxia telangiectasia related*) und der Kasein

Kinase II (Momand et al., 2000), die durch posttranslationale Modifikationen zur Stabilisierung von p53 beitragen.

Auch zellinterne Veränderungen können den intrazellulären p53-Spiegel ansteigen lassen: So induziert z.B. der Einfluss von Onkogenen wie ras, myc oder auch viralen Proteinen (adenovirales E1A, SV40 großes T-Antigen) die Expression von p14^{ARF}. Dieses Protein führt zu einer Stabilisierung von p53, indem es dessen Antagonist mdm2 hemmt (Michael und Oren, 2002).

Alle drei Mechanismen führen zu einer Stabilisierung von p53 und somit zu erhöhten Konzentrationen dieses Proteins. Die posttranslationalen Veränderungen wirken sich auf die Konformation von p53 aus und erhöhen damit seine Aktivität als Transkriptionsfaktor.

1.3.3 Funktion von p53

Wie unter 1.3.1 beschrieben, bindet p53 an spezifische Promoterelemente. Durch die Transaktivierungsdomäne werden die Faktoren der basalen Transkriptionsinitiationsmaschinerie an den Promoter herantitriert, wodurch die Anlagerung der RNA-Polymerase II ermöglicht und das p53-responsive Gen entsprechend verstärkt exprimiert wird (siehe Abbildung 1.3). Auf diese Weise induziert p53 die Transkription verschiedener Gene. Diese Gene gliedern sich in zwei große Gruppen (siehe auch Abbildung 1.2.): Regulatoren des Zellzyklus, wie z.B. p21, 14-3-3 σ oder GADD45 und Induktoren der Apoptose. Gene wie Noxa (Oda et al., 2000), PUMA (Nakano und Vousden, 2001) und bax (Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995) fallen in die letzte Kategorie.

p21 wurde als erstes durch p53 reguliertes Gen entdeckt ((Li et al., 1994)) und ist in der Lage, sowohl den G₁/S- als auch den G₂/M-Phasen-Übergang zu inhibieren. In epithelialen Zellen wird durch p53 auch ein Gen namens 14-3-3 σ induziert, dessen Produkt den Zyklin B1-CDK-Komplex außerhalb des Nukleus bindet und somit die Zelle in der G₂-Phase arretiert (Chan et al., 1999; Laronga et al., 2000). Die Induktion von GADD45 führt zu einer Hemmung von Zyklin B1 und inhibiert damit ebenfalls den G₂/M-Übergang. Dies gibt der Zelle somit Zeit, den entstandenen DNA-Schaden zu beheben, bevor dieser an die Tochterzellen weitergegeben werden kann.

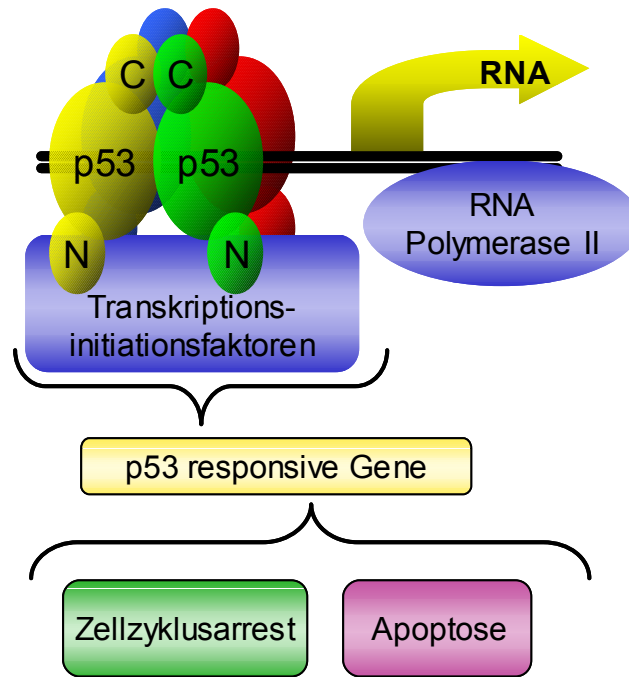


Abbildung 1.3: p53 als Transkriptionsfaktor. p53 bindet innerhalb der Promoterregion an bestimmte DNA-Sequenzen und rekrutiert den Transkriptionsinitiationskomplex an den Promoter. Dieser Komplex titriert seinerseits die RNA-Polymerase II an die DNA, so dass die Transkription p53-responsiver Gene initiiert werden kann

Ist der entstandene Schaden zu groß, um behoben zu werden, so leitet p53 die Apoptose ein. Aktiviertes p53 reguliert dabei die Expression verschiedener pro-apoptotischer Gene (siehe Tabelle 1.1). Bax war der erste pro-apoptotische Faktor, der durch p53 reguliert gefunden wurde. Bax gehört zur Bcl2-Familie der Apoptoseinduktoren und ist genau wie NOXA oder p53AIP in den Mitochondrien lokalisiert (Vogelstein et al., 2000).

p53 ist ebenfalls in der Lage, die Expression des *death receptors* Fas/Apo1 und damit die Aktivierung von Caspasen zu induzieren. Eine weitere Klasse p53-induzierter Gene wird von den sogenannte PIGs gebildet (*p53 induced genes*), die durch Modulation des intrazellulären Redoxpotentials Apoptose auslösen können (Polyak et al., 1997).

Interessanterweise aktiviert p53 jedoch nicht nur die Expression von apoptoseinduzierenden Proteinen, sondern blockt auch gezielt die Expression von anti-apoptotischen Proteinen, wie im Falle des Survivalfaktor Bcl-2 (Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995) (siehe Tabelle 1.1).

Gen	Funktion	Aktivierung/Repression durch p53
Noxa	pro-apoptotisches BH3-Protein	Aktivierung
PUMA	pro-apoptotisches BH3-Protein	Aktivierung
PIG3	Regulation des Redox-Gleichgewichtes	Aktivierung
p53AIP	Zerstreuung des Mitochondrien-Potentiales	Aktivierung
Bax	mitochondriales Protein	Aktivierung
APAF1	Aktivierung der Procaspase 9	Aktivierung
Fas/Apo1	Ligand des death receptors	Aktivierung
Bcl-2	anti-apoptotisches BH3-Protein	Repression

Tabelle 1.1: Liste von p53-responsiven Apoptoseregulatoren. Es sind sowohl p53-induzierbare als auch p53 reprimierbare Gene aufgelistet.

1.3.4 Transkriptionsrepression durch p53

Seit einiger Zeit wird in der Literatur das Phänomen der p53-vermittelten Repression diskutiert: Manche Gene werden durch p53 nicht transkriptionell aktiviert, sondern reprimiert. Ein solches Verhalten wurde für Gene wie *Survivin* (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002), *Stathmin* (Ahn et al., 1999; Johnsen et al., 2000; Murphy et al., 1999) und einige andere beschrieben (Badie et al., 2000; Gottifredi et al., 2001; Park et al., 2000; Taylor und Stark, 2001).

Vom Gen *Survivin* ist bekannt, dass es in einem Großteil aller Tumoren überexprimiert wird, während es in erwachsenen Normalgewebe undetektierbar ist (Ambrosini et al., 1997; Tamm et al., 1998). *Survivin* wird zellzyklusabhängig während der Mitose exprimiert und ist im Spindelapparat lokalisiert (Li et al., 1998). Am aminoterminalen Ende des Proteins befindet sich die sogenannte *baculovirus IAP repeat* Domäne, die Survivin zur Inhibition von Caspasen befähigt (Deveraux und Reed, 1999). In Neuroblastomen und Kolorektalkarzinomen korreliert starke *Survivin*-Expression mit sehr schlechten Prognosen.

1999 wurde erstmals publiziert, dass *Stathmin/op18* durch p53 reprimierbar sei. Es handelt sich dabei um ein 19kDa großes Protein, das im Zytoplasma lokalisiert ist und während akuter Leukämien überexprimiert wird (Sobel, 1991). *Stathmin* wird vom mitotischen Chromatin reguliert und hat Einfluß auf die Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose (Andersen et al., 1997). Die Regulierung von *Stathmin* stellt einen wichtigen Bestandteil der p53-abhängigen G₂/M Zellzyklus-Kontrolle dar (Johnsen et al., 2000).

Um die p53-vermittelte Repression zu erklären, wurden verschiedene Mechanismen diskutiert. Die naheliegenste Möglichkeit besteht darin, die p53-induzierte Apoptose als Ursache der transkriptionellen Repression zu postulieren: Denn das Einleiten des programmierten Zelltodes wirkt sich negativ auf die transkriptionelle Aktivität der Zelle aus. In einigen Fällen konnte die negative Transkriptionsregulation nur dann beobachtet werden, wenn gleichzeitig Apoptose eintrat (Murphy et al., 1996).

Desweiteren wurde postuliert, dass p53 direkt an den Promoter der reprimierten Gene bindet, diese jedoch nicht aktiviert, sondern einen Proteinkomplex herantitriert, der die Repression vermittelt (Hofmann et al., 2002). Eine dritte Möglichkeit bestünde darin, dass p53 die Repression nicht direkt vermittelt, sondern die Expression eines Repressors aktiviert. Ein möglicher Kandidat hierfür ist p21.

1.4 p21/waf1/CDKN1A, ein Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen

Von allen bekannten p53-responsiven Genen wird p21/waf1/cip1 am stärksten durch p53 induziert. Das Gen kodiert für einen Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen (*cyclin dependent kinases*, *cdks*). p21 inhibiert die Phosphorylierung von pRb, indem es die Kinasen (cdk 4 und 6), die normalerweise Phosphatgruppen auf pRb übertragen, inhibiert. Hypophosphoryliertes pRb verbleibt in einem Komplex mit den Transkriptionsfaktoren aus den Familien E2F und DP, wodurch diese Transkriptionsfaktoren nicht ihrer eigentlichen Arbeit nachgehen und E2F-abhängige Gene aktivieren können, sondern durch Bindung an pRb inaktiv gehalten werden. Durch Induktion von p21 durch p53 könnte somit die Transkription von E2F-responsiven Genen negativ reguliert werden.

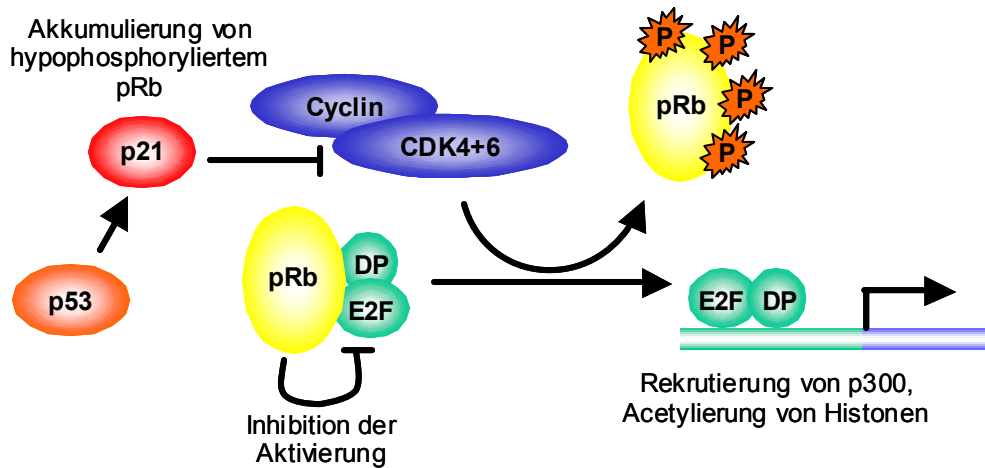


Abbildung 1.4: Auswirkungen der Induktion von p21 durch p53 auf den Phosphorylierungsstatus von pRb und die transkriptionelle Aktivierung durch E2F

1.5 p73 – ein p53-Homolog

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Homologe zu p53 existieren: p63 (Yang et al., 1998) und p73 (Kaghad et al., 1997) weisen große strukturelle und funktionale Ähnlichkeiten zu p53 auf. Ebenso wie p53 kann p73 die Transkription p53-responsiver Promotoren aktivieren und Apoptose induzieren (Jost et al., 1997).

Im Gegensatz zu p53 sind allerdings von p73 nur sehr wenige Fälle bekannt, in denen Mutationen dieses Proteins in Tumoren gefunden wurden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass es mehrere transkriptionell inaktive Isoformen von p73 gibt. Diese Isoformen entstehen einerseits durch unterschiedliches Spleißen von mRNA-Vorläufermolekülen, andererseits durch Benutzung von verschiedenen Promotoren zum Transkriptionsstart (Yang und McKeon, 2000). Der erste Promoter führt zur Expression einer transkriptionell aktiven Form, die p73TA genannt wird, während der zweite Promoters, der hinter dem dritten Exon des für p73TA codierenden Genes liegt, zur Expression einer transkriptionell inaktiven Form führt, die p73 Δ N genannt wird. Durch diese beiden Promotoren kommt es also zur Expression von p73-Formen, die sich am aminoterminalen Ende unterscheiden, während sie in weiter carboxyterminal gelegenen Bereichen gleich sind.

Die Δ N-Formen besitzen keine eigene Transkriptionsaktivierungsdomäne und sind daher nicht in der Lage, p53-responsive Promotoren zu induzieren.

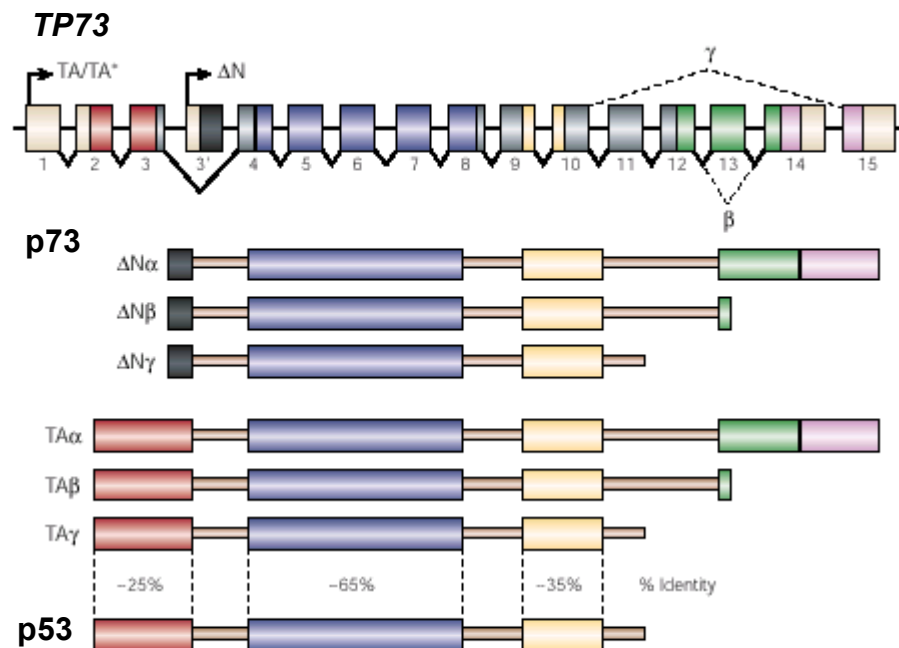


Abbildung 1.5: Genstruktur von TP53/TP73. Die Gene p53 und p73 haben eine sehr ähnliche Struktur: am aminoterminalen Ende ist in rot die Transaktivierungsdomäne dargestellt, gefolgt von der DNA-bindenden Zentraldomäne (flügelblau). Am C-Terminus schließt sich die Oligomerisierungsdomäne an (gelb). Im Falle von p73 folgen darauf noch das *steric α -motif* (SAM; grün), sowie die Post-SAM-Domäne (rosa). (nach (Yang und McKeon, 2000))

1.6 Adenoviren

1.6.1 Genomaufbau der Adenoviren

Zur Zeit sind über vierzig verschiedene humanpathogene Adenoviren bekannt (siehe Tabelle 1.1.). Ein besonderes Interesse zogen die Adenoviren 1962 auf sich, als gezeigt werden konnte, dass der Subtyp 12 in Nagetieren maligne Tumoren auszulösen vermag. Die Fähigkeit der Viren, Tumoren in Nagetieren zu erzeugen, dient auch heute noch neben Homologien der DNA, sowie Strukturen und Eigenschaften der Kapsidproteine als Kriterium zu ihrer Klassifizierung.

Subgenus	Virustyp	Zielorgan	Tumorbildung in Nagetieren
A	12, 18, 31	Gastrointestinaltrakt	hoch
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Lunge, Pharynx, Bindehaut	mittel
C	1, 2, 5, 6	Pharynx	niedrig
D	8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 44-47	Bindehaut	niedrig
E	4	Respirationstrakt	niedrig
F	40-41	Gastrointestinaltrakt	niedrig

Tabelle 1.2: Die Einteilung der humanen Adenoviren in Subgenera und Virustypen (Shenk, 1996)

Die Viruspartikel der Adenoviren sind 80-110nm groß und nicht membranumhüllt. Die Kapside sind ikosaedrisch aufgebaut, woran zwölf Strukturproteine beteiligt sind. Sie bestehen aus 254 Kapsomeren, 240 Hexonen und zwölf Pentonen. Die Pentone befinden sich an den Ecken des Ikosaeders und weisen eine fünfeckige Struktur auf. Sie bestehen aus einer Pentonbasis und einem Fiberprotein. Beide sind absolut notwendig für die Aufnahme des Virus in die Zelle: Das Attachment des Virus an die Zelle wird durch das Fiberprotein vermittelt, welches an den CAR-Rezeptor (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor) bindet (Bergelson et al., 1997; Bergelson et al., 1998). Die folgende Internalisierung wird herbeigeführt durch die Wechselwirkung der

Pentonbasis mit den αv -Integrinen. Die Integrine wiederum vermitteln schließlich die Clathrin-abhängige Endocytose des Virus (Einfeld et al., 2001; Nemerow und Stewart, 1999).

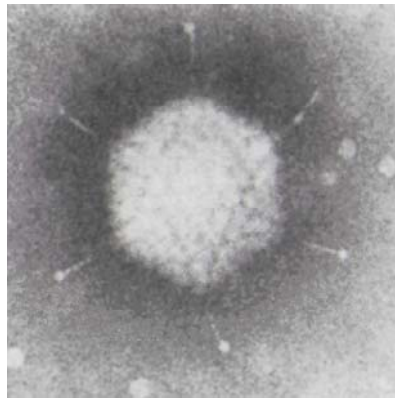


Abbildung.1.6: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirus (Shenk, 1996)

Das Adenovirusgenom besteht aus doppelsträngiger, linearer DNA und umfaßt je nach Adenovirustyp 36.000 bis 38.000 Basenpaare. Das Genom kann in beiden Richtungen transkribiert werden und enthält fünf kodierende Bereiche, von denen vier in der frühen Phase der Infektion exprimiert werden (E1 – E4; E = *early*).

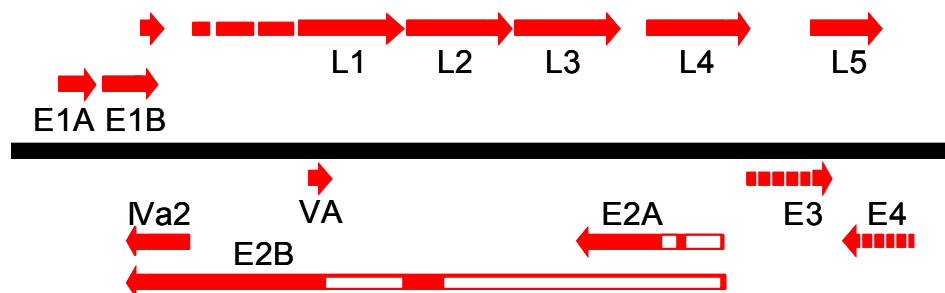


Abbildung.1.7: Die Struktur des adenoviralen Genoms

Der größte Teil des Genoms kodiert für die spät, d.h. nach Beginn der DNA-Replikation, synthetisierte RNA. Diese späte RNA (L = *late*) entsteht aus einem langen (ca. 30kb) Vorläufermolekül, das auf verschiedene Arten gespleißt werden kann, und kodiert für die Strukturproteine des Virus.

1.6.2 Phasen der Adenovirusreplikation

Die Replikation der Adenoviren gliedert sich in eine frühe und eine späte Phase, und kann weiter unterteilt werden in die folgenden vier überlappenden Abschnitte:

1. Transkription der frühen Gene, Synthese der frühen Proteine
2. DNA-Replikation
3. Transkription der späten Gene, Synthese der späten Proteine
4. Morphogenese der Viruspartikel

Die Abschnitte 2 und 3 beginnen dabei fast gleichzeitig. Die in den jeweiligen Phasen exprimierten Gene werden entsprechend als frühe oder späte Gene bezeichnet.

1.6.2.1 Frühe Phase

Nach Eintritt der Viruspartikel in die Zelle wird die virale DNA in den Zellkern transportiert. Durch die zelluläre RNA-Polymerase II werden die frühen adenoviralen Genregionen transkribiert. Als erstes kommt es zur Expression der E1-Region, wodurch zunächst die E1A-Proteine entstehen, die ihrerseits wiederum notwendig sind für die Aktivierung der anderen frühen Genregionen E2, E3 und E4.

E1-Proteine

Die E1A-Proteine aktivieren sowohl zelluläre als auch virale Promotoren. Sie sind in der Lage, in ruhenden Zellen, die sich in der G₀ oder G₁-Phase des Zellzyklus befinden, die DNA-Synthese zu aktivieren und so den Übergang in die S-Phase auszulösen (Jones, 1995).

Die beiden E1B-Proteine sind in ihrer Sequenz völlig verschieden. Beide E1B-Proteine entstehen jedoch durch alternatives Splicing eines gemeinsamen RNA-Vorläufermoleküles und beide haben die Fähigkeit, den programmierten Zelltod zu inhibieren.

Die E1-Proteine stellen die Gruppe der *immediate early genes* dar: Sie werden als erste im Infektionsverlauf synthetisiert. Ihre Synthese ist unabhängig von anderen neusynthetisierten viralen Faktoren. Die Proteine der E1-Region sind für die Transformation von Nagerzellen ausreichend (Barker und Berk, 1987).

Die E1B-Region kodiert für ein 19kDa und ein 55kDa großes Protein. Das E1B-19kDa-Protein ist einer der stärksten bekannten Inhibitoren der Apoptose. Das E1B-55kDa-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Transformation von Zellen, da es mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 interagiert (Sarnow et al., 1982). E1B-55kDa bindet an die transaktivierende Domäne von p53 und relokalisiert es so vom Nukleus ins Zytoplasma der Zellen, wodurch die p53-vermittelte Transaktivierung inhibiert wird. Die Zellen treten dadurch ungehindert in die S-Phase ein.

Das E1B-55kDa Protein ist zudem in der Lage, eine andere für den Infektionsverlauf sehr wichtige Funktion auszuüben: In einem Komplex (Goodrum et al., 1996; Sarnow et al., 1982) zusammen mit E4orf6 (E4-34kDa) fördert es den Export der viralen RNA aus dem Zellkern, während es gleichzeitig dafür sorgt, dass die zelluläre RNA dort verbleibt (*host cell shut down*). Dadurch nimmt die Stoffwechselaktivität der infizierten Zelle mit fortschreitender Infektionsdauer ab.

E4-Proteine

Die E4-Region bringt durch alternatives Slicing aus einem RNA-Vorläufer sechs verschiedene *open reading frames* hervor. Diese werden entsprechend als E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7 bezeichnet. Von E4orf3 ist bekannt, dass es fähig ist, die Expression von Methallothionein zu beeinflussen (Wienzek und Döbelstein, 2001).

1.6.2.2 Späte Phase

Während der späten Phase der Adenovirusreplikation wird das Genom des Virus im Zellkern repliziert, wobei ausschließlich neu replizierte DNA genutzt wird. Die Transkription erfolgt durch den *major late promoter* (MLP) und findet in sphärischen Arealen, die auch als Replikationszentren bezeichnet werden, statt. In diesen Replikationszentren wird die virale DNA und später auch die virale mRNA (L)

synthetisiert. Durch alternatives Splicing entstehen eine Vielzahl verschiedener später Transkripte, die größtenteils für virale Strukturproteine kodieren (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977; Shenk, 1996). Im Anschluss daran werden die neuen Virionen zusammengebaut.

Während des adenoviralen Infektionszyklus findet ein massiver Wechsel in der Promoteraktivität statt: der MLP-Promoter (*major late promoter*) zeigt zu Zeitpunkten kurz nach der Infektion lediglich ein sehr geringes Aktivitätsniveau, welches jedoch in den späten Phasen der Replikation um ein mehr als Hundertfaches gesteigert wird. Dieser Wechsel der Promoteraktivitäten wird begleitet von einer Rekrutierung der zellulären Transkriptionsfaktoren aus dem Nukleoplasma in die viralen Replikationszentren.

1.7 Expressionsanalyse mit cDNA-Mikroarrays

Die Expressionsanalyse mit cDNA-Mikroarrays ist eine Screening-Methode, die eine gleichzeitige Expressionsanalyse von mehreren tausend Genen in einem Experiment erlaubt. So können in einem Ansatz die wichtigsten Gene, die etwa bei der Adenovirusinfektion eine Rolle spielen, analysiert werden. Für jede untersuchte Zellpopulation kann somit ein individueller „Fingerabdruck“, ein Expressionsprofil, erstellt werden. Aus den Vergleichen dieser Expressionsprofile lassen sich dann Unterschiede erkennen, die mit dem verwendeten Stimulus (hier die Infektion mit wildtypischem Adenovirus) zusammenhängen müssen.

Der schematisierte Ablauf eine Expressionsanalyse mit cDNA-Mikroarrays ist in Abbildung 1.8 wiedergegeben:

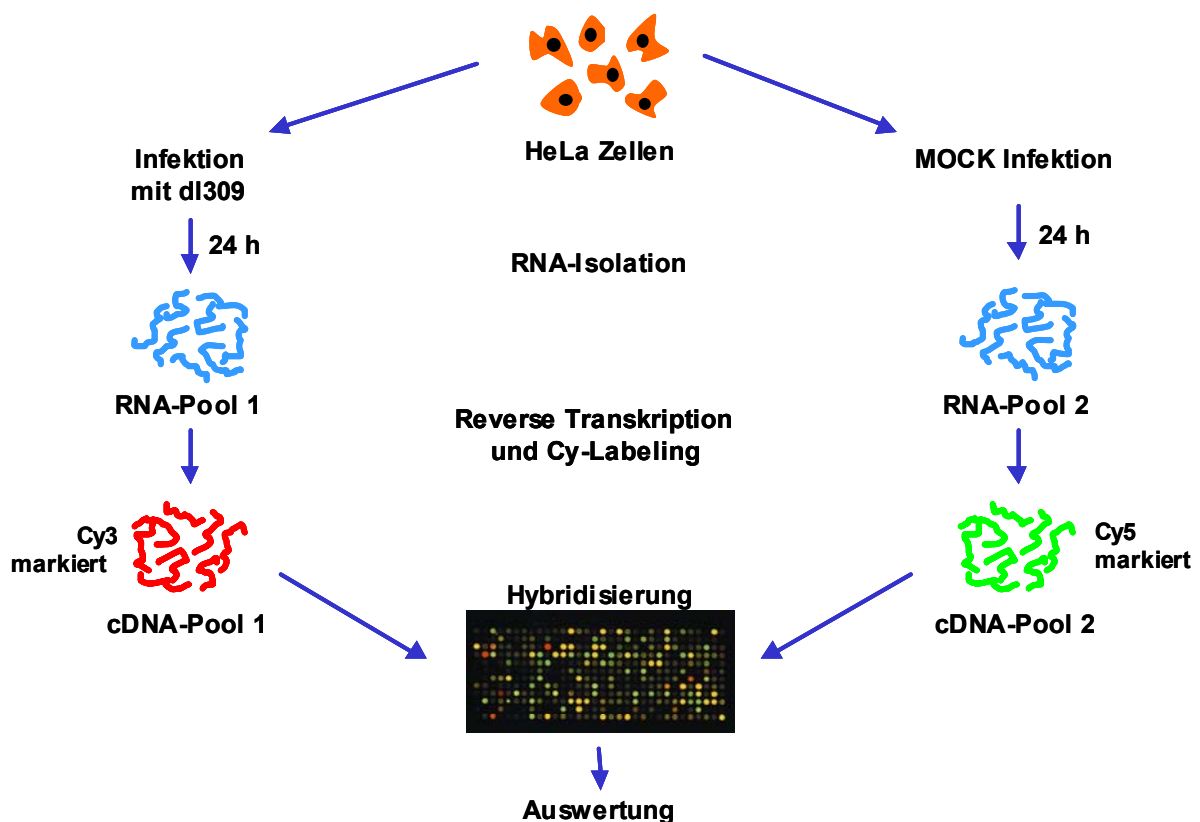


Abbildung 1.8: Ablauf einer Expressionsanalyse unter Verwendung von Mikroarrays.

Die RNA von Zellpopulationen, die miteinander verglichen werden sollen, wird revers transkribiert. Während dieses Vorganges werden dCTPs eingebaut, an die

unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3 oder Cy5) gekoppelt sind. Die beiden Pools unterschiedlich markierter DNA werden nach einem Aufreinigungsschritt miteinander gemischt. Anschließend werden sie mit immobilisierten cDNA-Proben für 4.600 Gene hybridisiert. Dies findet auf einem Glasobjektträger (*chip*) statt.

Da die Absorptionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe relativ weit voneinander entfernt liegen (siehe Abbildung 1.9), ist es möglich, für die Hybridisierung der zwei RNA-Pools den gleichen Chip zu benutzen, was die Abweichungen innerhalb eines Experimentes relativ gering hält. Nach der Hybridisierung wird das Ergebnis mit Hilfe zweier Laserscanner unterschiedlicher Wellenlänge eingelesen und mit entsprechenden Computerprogrammen ausgewertet.

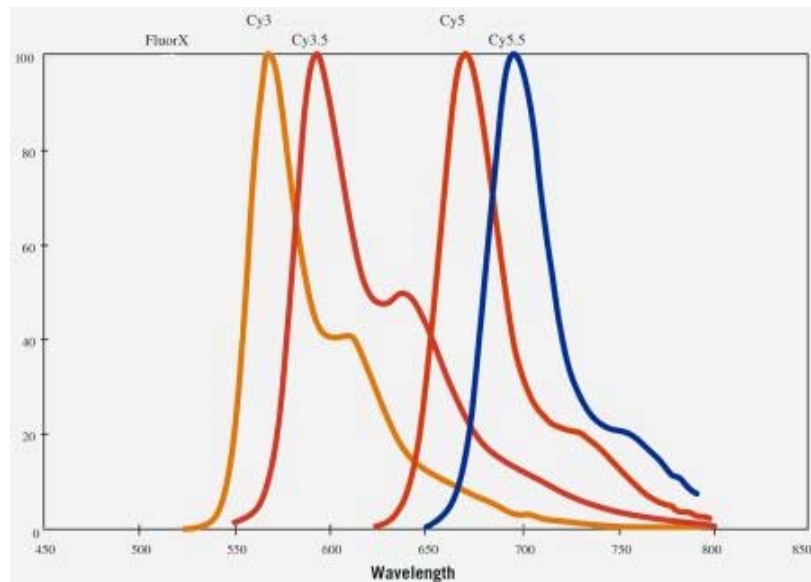


Abbildung 1.9: Absorptionskurven der fluoreszierenden Farbstoffe Cy3 (gelb) und Cy5 (orange)

1.8 Aufgabenstellung

1.8.1 Negative Transkriptionsregulation durch p53

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus, der der Repression von Genen wie *Survivin* und *Stathmin* durch p53 zugrunde liegt, untersucht werden. Insbesondere wurde folgenden Fragen nachgegangen:

Ist die Repression ein Epiphänomen der Apoptose? D.h. steht die Repression dieser Gene in keinem direkten kausalen Zusammenhang mit der Expression von p53, sondern ist sie lediglich eine Begleiterscheinung, die im Verlauf der Apoptose auftritt?

Bindet p53 direkt an die Promotoren der betroffenen Gene, und führt es auf diesem Wege zur Repression? p53 ist ein Protein, das bekannterweise durch transkriptionelle Aktivierung die Expression von Genen wie *bax*, *p21* oder *PIG3* reguliert (Vogelstein et al., 2000). Es wird jedoch kontrovers diskutiert, ob p53 auch unmittelbar als Repressor wirken könnte.

Wird durch p53 die Expression eines Genes verstärkt, dessen Produkt eine reprimierende Wirkung auf Gene wie *Survivin* und *Stathmin* ausübt?

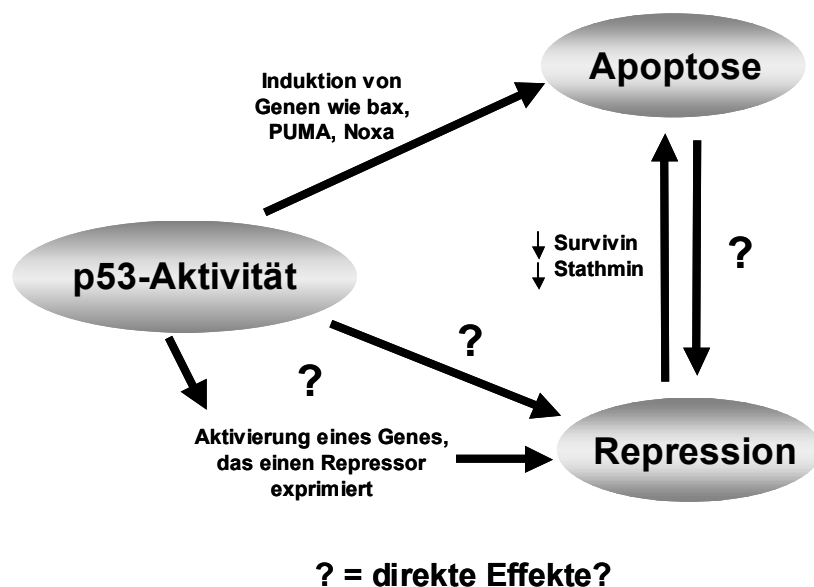


Abbildung 1.10: Aktivitäten von p53 und deren Wechselwirkungen untereinander. Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden Wirkungen sind in obigem Schema mit einem Fragezeichen markiert.

1.8.2 Beeinflussung der zellulären Transkription durch Infektion mit dem wildtypischen Adenovirus (dl309)

Während des Infektionszyklus der Adenoviren findet ein massiver Aktivitätswechsel der viralen Promotoren und damit auch ein drastischer Wechsel in der Transkription der Virusgene statt. Während der *major late promoter* (MLP) in der frühen Phase der Infektion nur eine geringe Aktivität aufweist, steigert sich diese mehr als hundertfach in der späten Phase des Infektionszyklus. Eine starke Veränderung des viralen Transkriptionsmusters könnte mit extremen Veränderungen der zellulären Transkription einhergehen, etwa durch Modulation oder Relokalisation von Transkriptionsfaktoren.

Aus diesem Grunde wurde die Frage untersucht, wie die zelluläre Transkription durch eine Adenovirusinfektion in der späten Phase beeinflusst wird.

2. Material

Wichtige Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Gesonderte Auflistungen der eingesetzten Medien, Puffer und Lösungen, Antikörper, Kits, Zelllinien sowie Viren, Bakterien und Vektoren befinden sich in nachfolgenden Unterkapiteln.

2.1. Chemikalien

Agarose (Electrophoresis grade)	Life Technologies
Alkalische Phosphatase	Roche
Ammonium persulfate (APS)	BioRad
Ampicillin	Roche
Bacto-Agar	Bayer
BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad
BSA (Rinderserumalbumin)	Roche
Ciprofloxacin („Ciprobay“)	Bayer
Cyanine 5-dCTP und Cyanine 3-dCTP	NEN Life Science Products
DNA-Längenstandards	Roche
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	Merck
DNase I	Stratagene
dNTP Mix	Gibco
EDTA	Merck
Expand High Fidelity	Roche
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies
Fluoprep	BioMérieux
FuGene (Transfektionsreagenz)	Roche
Gewebekulturmateriale	Costar
	Greiner
	Life Technologies
	Nunc
Glykogen	Roche
Human cot1-DNA	Invitrogen

H ₂ O, RNase-frei	Ambion
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Roche
L-Glutamin	Life Technologies
Lipofectamine 2000 (Transfektionsreagenz)	Life Technologies
Lipofectamine PLUS (Transfektionsreagenz)	Life Technologies
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
Oligonukleotide („Primer“)	MWG Biotech
Oligo dT 15-mer	Roche
Paraformaldehyde	Merck
Penicillin / Streptomycin-Gemisch	Life Technologies
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Protein-Größenstandards („Rainbow“-Marker)	Amersham
Radiographiefilme (Biomax MR, X-Omat AR)	Eastman Kodak Company
Ribonuklease H (RNase H)	Life Technologies
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
	Roche
RNase block (20 U/μl)	Stratagene
Roti-Phenol	Roth
Superfect (Transfektionsreagenz)	Qiagen
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Life Technologies
SuperSignal West Ultra / Dura / Femto	Pierce
T4 DNA Ligase (High Concentration)	MBI
TEMED	BioRad
T4 DNA ligase (High Concentration)	MBI Fermentas
Tetracyclin	Life Technologies
Trypsin-EDTA	Life Technologies
Triton X-100	Serva
Trizol Reagenz	Life Technologies
Tween-20	Serva

2.2. Medien

Medien für die Bakterienkultur:

2YT-Medium (Fertigpulver)	Sigma
LB-Medium (Fertigpulver)	Sigma

Den verwendeten Medien wird nach dem Ansetzen und Autoklavieren das jeweils benötigte Antibiotikum (Ampicillin 200 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml) unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Wenn statt des Flüssigmediums Agarplatten verwendet werden, wird den Medien vor dem Autoklavieren Bactoagar in einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v) zugegeben.

Medium für die Zellkultur:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (25 mM HEPES-gepuffert)	Life Technologies
---	-------------------

2.3. Puffer und Lösungen

Formamid-EDTA-Dextranblau-Probenpuffer für die Sequenzierung:

- 1 Volumenteil 25 mM EDTA (pH 8,0 bei 25 °C)
- 5 Volumenteile Formamid
- 50 mg/ml Dextranblau

Laufpuffer für SDS-PAGE (10×):

- 151 g Tris
- 720 g Glycin
- 50 g SDS
- H₂O bidest. ad 5 l

pH-Wert nicht einstellen, die verdünnte Lösung hat einen pH von 8,3

PBS (Phosphat Buffered Saline):

- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,15 g Na₂HPO₄
- 0,1 g MgCl₂ (fehlt bei PBS^{def})
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,13 g CaCl₂ (fehlt bei PBS^{def})
- H₂O bidest. ad 1 l
- autoklavieren

PBS^{def.}:

- Zusammensetzung wie PBS, ohne MgCl₂ und CaCl₂
- autoklavieren

Ponceau S-Lösung zum Anfärben von Proteinen:

- 0,5 g Ponceau S in 1 ml Eisessig geben und kräftig schütteln
- 100 ml H₂O bidest. zugeben
- Lösung nicht länger als 1 Monat verwenden

Probenpuffer für Agarose-Gelelektrophorese (6×):

- 0,1 % Bromphenolblau
- 0,1 % Xylencyanol
- 30 % Glycerin
- in H₂O bidest.

Probenpuffer für SDS-PAGE (2×):

- 2 ml Glycerin
- 3 ml 20 % SDS
- 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8
- 0,25 ml 1 % Bromphenolblau
- 1 ml β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen)

Puffer für SDS-PAGE-Trenngel (1,5 M Tris pH 8,8 + SDS):

- 90,8 g Tris
- in ca. 400 ml H₂O bidest. lösen, pH-Wert mit Salzsäure einstellen
- 20 ml 10 % SDS
- H₂O bidest. ad 500 ml

Puffer für SDS-PAGE-Sammelgel (0,5 M Tris pH 6,8 + SDS):

- 30,3 g Tris
- in ca. 400 ml H₂O bidest. lösen, pH-Wert mit Salzsäure einstellen
- 20 ml 10 % SDS
- H₂O bidest. ad 500ml

RIPA-Lysispuffer:

- 20 mM Tris-HCl pH 7,5
- 150 mM NaCl
- 10 mM EDTA
- Trasylol (100.000 KIE)
- 1 % Triton X-100
- 1 % DOC
- 0,1 % SDS

für 500 ml:

- 10 ml 1M Tris pH 7,5 Stammlösung
- 4,38 g NaCl
- 2,22 g EDTA
- 5× 5 ml-Ampulle
- 5 ml Triton X-100
- 50 ml 10 % DOC
- 5 ml 10 % SDS
- H₂O bidest. ad 500 ml

SSC (20×):

- 175,3 g NaCl (≡ 3 M)
- 88,2 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (≡ 0,3 M)
- in 800 ml H₂O lösen
- pH mit HCl auf 7,0 einstellen
- H₂O ad. 1 l

Transferpuffer für Naß-Blot:

- 100 ml 10× Western-Salze
- 750 ml H₂O bidest.
- 150 ml Methanol

Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Laufpuffer für Agarose-Gelelektrophorese (50×):

- 242 g Tris
- 57,1 ml Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- H₂O bidest. ad 1 l
- autoklavieren

Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Laufpuffer für Sequenziergele (10×):

- 108 g Tris/HCl
- 35 g Borsäure
- 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- H₂O bidest. ad 1 l
- autoklavieren

Western-Salze (10×):

- 60,55 g Tris
- 288,1 g Glycin
- 4 ml 10 % SDS (entsprechend 0,02 %)
- H₂O bidest. ad 2.000 ml
- pH-Wert der Lösung auf 8,3 einstellen

2.4. Antikörper**Proteinspezifische Antikörper („Erstantikörper“):**

Anti-c-myc (Maus, monoklonal, 9E10)	Sant Cruz Biotechnology
Anti-p21 (Maus, monoklonal, Ab-1)	Calbiochem
Anti-PARP (Maus, monoklonal, Ab-2)	Calbiochem
Anti-Actin (Maus, monoklonal, C-2)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p53 (Pab1801)	Calbiochem
Anti-Lamin B (Maus, monoklonal)	Zymed
Anti-E1A (Ab-1)	Calbiochem
Anti-E2A (Maus, monoklonal, B6-6)	Sant Cruz Biotechnology

Speziesspezifische Antikörper („Sekundärantikörper“):

Anti-Maus-IgG HRP-gekoppelt (Ziege, monoklonal)	Jackson
Anti-Maus-IgG „Alexa Fluor 594“ (rot)	Molecular Probes
Anti-Maus-IgG „Alexa Fluor 488“ (grün)	Molecular Probes

2.5. Kits

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
BCA Protein Assay Kit	Pierce
E.Z.N.A Plasmid Miniprep KitII	peqLab
Luciferase Assay Kit	Promega
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

2.6. Plasmide & Vektoren

pRCp53	(Lin et al., 1994)
pBP100luc	(Roth et al., 1998)
pcDNA3	Life Technologies
pGL3minimal promoter	(Contente et al., 2002)
pGL3p73TAprom	(Stiewe und Putzer, 2000)
pGL2SURVIVINluc	(Li und Altieri, 1999)

2.7. Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide wurde bei der Firma MWG Biotech (München) in Auftrag gegeben.

Primersequenzen (Negative Transkriptionsregulation durch p53):

Gen	Reverse Transkription	Hin-Primer	Rück-Primer
Survivin	CAG AGG CCT CAA TCC ATG GCA GCC	GGC AGC CCT TTC TCA AGG ACC ACC	GAT GGC ACG GCG CAC TTT CTT CGC
Stathmin	CCT TCT GAA GCA CTT CTT TCT C	GTC GTC AGG CGG CTC GGA CTG	CTC TCG TTT CTC AGC CAG CTG C
Ubiquitin C	ACT GGG CTC CAC CTC AAG GGT GAT	GTC GCA GCC GGG ATT TGG GTC GCG	GTC TTG CCA GTG AGT GTC TTC ACG
PIG3	CGG TGA GCA GGC CTC TGG GAT GGC	GTG CAC TTT GAC AAG CCG GGA GGA	CAG CCT GGG TCA GGG TCA ATC CCT
p21	GGA AAA GGA GAA CAC GGG ATG AGG AGG	CCT GGC ACC TCA CCT GCT CTG CTG	GCA GAA GAT GTA GAG CGG GCC TTT
BRCA1	oligo dT-15mer	CCA AAG CGA GCA AGA GAA TCC CAG	TCA GGT AGG TGT CCA GCT CCT GGC
CHK1	oligo dT	CCT TTG TGG AAG ACT GGG ACT TGG	CAT CTT GTT CAA CAA ACG CTC ACG
POLD1	oligo dT	GCC GCA CAG TGC TCA GCC ACC AGG	CGC ATG TAG AAG ATG GGG CAG TCC
TOP2 α	oligo dT	TGT CGT GTC AGA CCT TGA AGC TG	CCT TGG ATT TCT TGC TTG TGA CTG
CyclinB1	oligo dT	CCT CTA CCT TTG CAC TTC CTT CGG	GAG TGC TGA TCT TAG CAT GCT TCG
CyclinA2	oligo dT	AGC AGC CTG CAA ACT GCA AAG TTG	TGG TGG GTT GAG GAG AGA AAC ACC
CDC2	oligo dT	CCT TGC CAG AGC TTT TGG AAT ACC	GAC ATG GGA TGC TAG GCT TCC TGG
CDC25C	oligo dT	GTA TCT GGG AGG ACA CAT CCA GGG	CAA GTT GGT AGC CTG TTG GTT TG
LBR	oligo dT	TGG CTT TTG GAG ACT TGG TGT GGG	ATC ACC CAA GTA ATT GGG GTG GCG

Primersequenzen (Beeinflussung der Adenovirus-Replikation durch Myc):

Gen	Reverse Transkription	Hin-Primer	Rück-Primer
Leptin	GCA CTG CAST AAG GTG GCA GCT GCC	GGC GGG CGT TAA AGC TCT CGT GGC	TAA AGT GCT ACC ACT GCT CCC AGC
Pentraxin	CTG TAC TGC TCG AGG TTC TCC AGG	GCC GAC GCG CTT CAT CTG CAC TTC	GTT TTG AGC GAT TGC AAA GTT TGC
CD24	ACG TGG AGG AAT TAC AGT AAC ACC	TGC TGG CAC TGC TCC TAC CCA CGC	AAT CTC CAT TCC ACA ATC CCA TCC
Serine Protease	GCT TCT GGG TTC CTT TCA CAT AGG	GGA AAC CCA CTT GGC CTG CAT ACC	TCC ATC GTG TAT GCA GTG GGC AGC
Ankyrin	TCA CCA CTG ACA GCA AGA ATA AGG	AAC ACC TTT GCA CCT AGC CTG TGC	TCA AGA TCA GCT TCG TAT TCA AGC
LOXL-1	CTT GAG GAT GTA GTT CCC AGG CTG	GTC TCC CTG ACT TGG TCC CAG ACC	CCG CAT TGT AGG TGT CAT AGC AGC

C-MYC	GCC ACC GCC GTC GTT GTC TC	AGC CAG CGG TCC GCA ACC CTTGCC	AGC TCG AAT TTC TTC CAG ATA TCC
HPRT	CTT CGT GGG GTC CTT TTC ACC AGC	GTG ATG ATG AAC CAG GTT ATG ACC	ACC TTG ACC ATC TTT GGA TTA TAC
TOB1	TAC AGC AGC AGA GTG ACC AAA AGG	TAT GCA GCT TGA AAT CCA AGT AGC	TGG AGA GCT GGA CAC TGA TGA GGC

Verwendete Primer für die ortsgerichtete Mutagenese:

Plasmid	Hin	Rück
pSURVIVINluc (p53-site)	GAG GGC GTG CGC TCC CGG GAT GCC CCG CGG CGC GCC	GGCGCG CCG CGG GGC ATC CCG GGA GCG CAC GCC CTC

2.8. Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden für die Amplifikation der Plasmide verwendet:

<i>Epicurian coli</i> Sure electroporation-competent cells	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> ElektroMAX DH10B	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> BJ5183	Life Technologies

2.9. Viren

rAdGFP	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches das GFP-Protein exprimiert
rAd5E1B-19K	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und das E1B-19kDa-Protein von Adenovirus Typ 5 exprimiert
rAdp53	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und p53 exprimiert
rAd β -Gal	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und β -Galactosidase exprimiert
rAd-c-myc	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und c-myc exprimiert

rAdp21	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches p21 exprimiert
rAdSV40 T-Ag ₁₋₂₆₀	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und die Aminosäuren 1 bis 260 des großen T-antigenes des <i>simian vacuolating virus 40</i> exprimiert

Diese Viren wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Döbelstein nach dem „AdEasy“-Verfahren hergestellt (Koch *et al.*, 2001). Der rAdp21 wurde freundlicherweise von G. Nabel und der rAd-c-myc von H. Hermeking zur Verfügung gestellt.

2.10. Eukaryontenzellen

Verwendete permanente Zelllinien:

HeLa (American Type Culture Collection-(ATCC-)Nr. CCL2)

- humanes Uteruskarzinom (epitheloid); HPV 18-transformiert, enthalten E6-Protein und E7-Protein von HPV

H1299 (Gabe von A. J. Levine)

- humane Großzellen-Lungenkarzinomzellen; p53 -/-

HER911 (Introgene)

- *in vitro* hergestellt aus humanen Retina-Zellen durch Adenovirus-E1-Transformation (Fallaux *et al.*, 1996)

HEK293 (ATCC-Nr. CRL-1573)

- *in vitro* hergestellt aus humanen Nierenzellen durch Adenovirus-E1-Transformation (Graham *et al.*, 1977)

HCT 116 (ATCC-Nr. CL-247)

- humanes Kolonkarzinom, p53-/- und p21-/- Subtypen *in vitro* hergestellt durch Transformation (Vogelstein *et al.*, 1988)

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Zellkulturtechnik

Zur Kultivierung von adhärenenten Zelllinien werden ventilierte Kulturflaschen verwendet, welche bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit (RH) und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert werden. Dem verwendeten Nährmedium (*Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) mit 25 mM HEPES-Puffer) werden je 500 ml-Flasche noch folgende Zusätze beigelegt:

- 10 % Fötale Kälberserum (FCS)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 2,5 ml Penicillin / Streptomycin (5.000 U/ml Penicillin G (Na-Salz); 5.000 µg/ml Streptomycin-Sulfat)
- 200 µl Tetracyclin (5 mg/ml)
- 2,5 ml Ciprofloxacin („Ciprobay“; 2 mg/ml)

Für das Umsetzen der Zellen erfolgt zunächst die Abnahme des Mediums; anschließend wird der Zellrasen mit PBS^{def} gewaschen, um Reste von Serum zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen folgt eine Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung für 2-10 Minuten (abhängig vom Zelltyp) bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH. Durch den Chelatbildner Ethylendiaminetetraacetat (EDTA; 0,05 %) werden die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca²⁺-Ionen gebunden; die Protease Trypsin (0,025 %) sorgt für das Herauslösen der Zellen aus ihrem Verband durch Spaltung der Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und zum Gefäßboden. Nach dem Ablösen wird der Zellsuspension frisches Kulturmedium zugesetzt. Überschüssiges Trypsin wird durch die im Serum enthaltenen Protease-Inhibitoren inaktiviert. Es folgt das Aussäen der Zellen in ein neues Kulturgefäß (Passage); für die kontinuierliche Kultur werden die Zellen abhängig von der Zelllinie, jedoch nicht höher als 1:10 verdünnt. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden.

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet (Kammerfaktor = 10^4). Frisch trypsinisierte Zellen werden in einem kleinen Volumen Kulturmedium aufgenommen, und ein Tropfen der Suspension wird zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Ausgezählt werden jeweils 4 Großquadrate; nach Berechnung des Mittelwerts für ein Quadrat erhält man durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor die Anzahl der Zellen pro Milliliter.

Von den verwendeten Zellen werden von einer möglichst frühen Passage mehrere Aliquote in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu werden die Zellen trypsinisiert und nach Zugabe von frischem Medium bei $800\times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in einer auf Eis vorgekühlten Lösung aus 10 % DMSO in FCS resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese werden zunächst in Papiertücher gewickelt und über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam abgekühlt, bevor der Transfer in flüssigen Stickstoff erfolgt.

Für das Auftauen der Zellen wird frisches Medium in eine Gewebekulturflasche vorgelegt. Nach Entnahme der tiefgefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff werden diese mittels Handwärme aufgetaut und dann sofort in die Zellkulturflasche überführt. Es folgt die Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5 % CO_2 / 95 % RH.

3.1.2. Herstellung eines Virusstocks

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Adenoviren, welche nach dem „AdEasy“-System hergestellt wurden und bei denen die E1-Region vollständig deletiert wurde, können nur in den E1-komplementierenden Zelllinien HEK293 und HER911 vermehrt werden.

Zunächst werden Zellen, die zu 60-80 % konfluent gewachsen sind, zweimal mit PBS^{def} gewaschen, um durch Entfernen des Serums eine effiziente Infektion der Zellen zu gewährleisten. Anschließend erfolgt die Inokulation der Zellen mit Virussuspension in einem geringen Volumen (5 ml für 162 cm^2 -Kulturflaschen) von serumfreiem Dulbecco's Medium (m.o.i. $\approx 0,5$ -1). Nach Adsorption des Virus an die Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5 % CO_2 / 95 % RH auf einem Schwenkbrett für 1 Stunde folgt das Entfernen des Inokulums und die Zugabe von 30 ml 1x Dulbecco's Medium mit 10 % FCS.

Die Virusernte wird durchgeführt, sobald sich etwa 50 % der Zellen vom Boden abgelöst haben. Nach Abschaben der verbliebenen anhaftenden Zellen ins Medium werden diese durch Zentrifugation für 5 min bei 800×g und 4 °C pelletiert. An das Waschen der Pellets mit PBS^{def} schließt sich eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen an. Nun werden die Pellets in je 1 ml PBS^{def} aufgenommen und die Zellen durch dreimaliges Frieren und Tauen aufgeschlossen. Die dadurch freigesetzten Viruspartikel werden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.3. Titerbestimmung

Zur Titration der Virusstocks werden HER911-Zellen verwendet. Am ersten Tag werden je $3 \cdot 10^4$ Zellen in 500 µl 1x Dulbecco's Medium mit 10 % FCS auf Vierkammer-Objektträger ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dann werden vom Virusstock serielle Verdünnungen (10^{-4} bis 10^{-7}) in 1 ml Medium ohne FCS hergestellt. Nach Abnahme des Mediums werden die Zellen mit je 500 µl Suspension (pro Kammer) der Verdünnungen inokuliert. Die weitere Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH erfolgt zunächst für eine Stunde auf einem Schwenkbrett und danach stehend. Am dritten Tag werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gegen das frühe DNA-bindende Adenovirusprotein E2A-72 kDa, sowie mit DAPI gefärbt (siehe Kapitel 2.4 und 3.2.1). Mittels Fluoreszenzmikroskop wird nun für zufällig ausgewählte Gesichtsfelder das Verhältnis von E2A-positiven Zellen (diffuse Kernfärbung in der frühen Infektionsphase, später ist das Protein in punktförmigen Replikationszentren lokalisiert) zu DAPI-gefärbten Zellkernen bestimmt. Für eine korrekte Titerbestimmung sollten nicht mehr als 10-30 % der Zellen infiziert sein (Vermeidung von Doppelinfektionen einzelner Zellen). Errechnet wird der Titer durch die Formel $T = (\text{Anteil der infizierten Zellen}) \times 5 \cdot 10^4 \times 2 \times \text{Verdünnung}$.

3.1.4. Transduktion von Eukaryontenzellen

Für die Infektion von Zellen mit rekombinanten Viren (Transduktion) werden in Sechskammer-Schalen (Kammerdurchmesser 30 mm), abhängig vom Zelltyp, am Tag zuvor 200.000-600.000 Zellen (je nach Zelltyp) pro Kammer ausgesät. Nach

Inkubation im Brutschrank über Nacht wird das vorhandene Medium abgenommen, und die Zellen werden mit 500 µl Virussuspension in DMEM_{PUR} inokuliert. Es folgt eine einstündige Inkubation auf einem Schwenkbrett im Brutschrank, danach wird mit DMEM_{VOLL} auf 3 ml aufgefüllt. Die m.o.i. (eingesetzte Viruspartikel pro Zelle) hängt dabei von Zelllinie und experimentellem Ansatz ab.

3.1.5. Liposomen-vermittelte Transfektion von Eukaryontenzellen

Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen wird über Liposomen-vermittelte Transfektion erreicht (Felgner *et al.*, 1987; Felgner und Ringold, 1989). Hierbei erfolgt die Aufnahme der DNA in Form von Komplexen mit artifiziellen Liposomen, die eine Verschmelzung mit der Plasmamembran vermitteln. Das optimale Verhältnis zwischen DNA und den verwendeten Lipiden muß dabei experimentell ermittelt werden.

Für die Transfektion von Zellen in Sechskammer-Schalen (Kammerdurchmesser 30 mm) werden am Vortag 200.000 Zellen je Kammer in 1x Dulbecco's Medium mit 10 % FCS ausgesät und anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Transfektion ist für die meisten Studien eine Inkubationszeit von 24-48 Stunden bis zur Ernte oder Fixierung der Zellen optimal. In den folgenden Unterkapiteln sind jeweils die Mengen für eine Kammer angegeben.

3.1.5.1. Lipofectamine2000

Pro Transfektionsansatz werden 2,4 µg Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 200 µl DMEM_{PUR} gemischt. In einem weiteren Gefäß werden je 200 µl DMEM_{PUR} mit 8 µl Lipofectamine2000 gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Mischen der beiden Ansätze erfolgt eine Inkubation bei RT für weitere 20 min. Nun werden die Transfektionsansätze zum vorhandenen Medium gegeben und die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert.

3.1.5.2. Lipofectamine PLUS

Vor der Transfektion wird das vorhandene Medium abgenommen und gegen 800 µl DMEM_{PUR} ausgetauscht. Pro Transfektionsansatz werden nun 1 µg Plasmid-DNA in

ein Reaktionsgefäß vorgelegt; dazu werden 100 µl DMEM_{PUR} und 6 µl PLUS-Reagenz gegeben und gut gemischt. In einem zweiten Gefäß werden jeweils 100 µl DMEM_{PUR} mit 4 µl Lipofectamine gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Ansätze werden nun vereinigt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe der Transfektionsansätze zu den Zellen. Nach einer Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH für 3 h wird der Ansatz abgenommen, und die Zellen werden mit 3 ml DMEM_{VOLL} weiter inkubiert.

3.1.5.3. FuGene

Pro Transfektionsansatz werden 1,5 µg Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Pro Transfektionsansatz werden 100 µl DMEM_{PUR} und 5 µl FuGene Reagenz gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit werden je 105µl der DMEM_{PUR}/FuGene-Mischung zur DNA pipettiert und diese Mischung weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe der Transfektionsansätze zum vorhandenen Medium und die Zellen werden weiter im Brutschrank inkubiert.

3.2. Proteinchemische & Immunologische Methoden

3.2.1. Indirekte Immunfluoreszenz (IFA)

Für die Analyse von Proteinen in der indirekten Immunfluoreszenz werden zunächst Zellen in Vierkammer-Objektträger (4K-OT) ausgesät (3-5·10⁴ Zellen je Kammer in 500 µl DMEM_{VOLL}) und über Nacht bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH inkubiert.

Am darauffolgenden Tag werden die Zellen 2× kurz mit PBS gewaschen und dann für 15 min bei RT mittels 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen erfolgt die Permeabilisierung der Zellen durch Behandlung mit 0,2 % Triton X100 in PBS für 20 min, erneut gefolgt von 4 Waschschritten. Nicht bewachsene Stellen des Objektträgers werden durch Zugabe von Blocklösung (10 % FCS in PBS) für 10 min bei RT abgesättigt. Hieran schließt sich die Inkubation mit dem proteinspezifischen Antikörper (verdünnt in Blocklösung) für 1 h an. Dann werden die Zellen zweimal kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit dem

speziesspezifischen, sekundären Antikörper („Alexa“-Antikörper, 1:500 in Blocklösung) für 30-60 min im Dunkeln inkubiert. Bei Bedarf wird bei diesem Schritt gleichzeitig die DAPI-Färbung durchgeführt, indem eine Stammlösung DAPI (10 mg/ml in H₂O) 1:10⁴ in Blocklösung verdünnt und diese Lösung dann zum Ansetzen des speziesspezifischen Antikörpers verwendet wird. Danach schließen sich erneut Waschschriffe an (2× kurz, einmal 5 Minuten in PBS), bevor die Zellen in Fluoprep fixiert werden. Zur Auswertung werden die Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

3.2.2. Immunoblot

3.2.2.1. Ernten der Zellen für den Immunoblot

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen werden die jeweiligen Zellen zunächst ins vorhandene Medium abgeschabt und durch Zentrifugation für 5 min bei 1000×g (4°C) pelletiert. Der Überstand wird nun verworfen und das Zellsediment in 200 µl RIPA-Puffer lysiert (auf Eis). Nach Zugabe von 100 µl Laemmli-Puffer werden die Proben für mindestens 2 Stunden bei 4 °C geschüttelt, um die DNA zu scheren. Es schließt sich eine 5minütige Inkubation bei 95 °C an, gefolgt von einer Zentrifugation für 2 min bei 15.000×g und 4 °C. Die Proben können jetzt auf ein Gel aufgetragen oder bei –20 °C gelagert werden.

3.2.2.2. Naßblot

Als Methode zum Proteintransfer auf Membranen wird das Naß-Verfahren angewendet (es werden Nitrocellulose-Membranen eingesetzt). Hierbei wird lediglich ein einzelner Puffer benötigt (Transferpuffer Naß-Blot). Der Blot-Aufbau befindet sich senkrecht zwischen zwei von Platindrähten durchzogenen Plastikwänden, die als Kathode und Anode dienen, und ist vollständig im Transferpuffer eingetaucht. Auf diese Weise wird eine Pufferdepletion vermieden, so daß längere Transferzeiten möglich sind.

Aufbau:

Kathode (negativ)

Schwamm

3 Lagen Filterpapier

Polyacrylamidgel

Membran

2 Lagen Filterpapier

Schwamm

Anode (positiv)

Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 38 V über Nacht werden die Proteine auf die Membran übertragen. Es muß beim Abbau des Blots ein Austrocknen der Membran verhindert werden. Anschließend wird die Membran für 30 - 60 min in Milch (10% Milchpulver in PBS / 0,2 % Tween 20) eingelegt und bei RT auf einem Schwenkbrett (120 upm) inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Die immobilisierten Proteine können wiederum immunologisch nachgewiesen werden.

3.2.2.3. Detektion der Proteine

An das Blocken der Membran schließt sich der immunologische Nachweis der Proteine an. Dazu wird die Membran zunächst mit dem proteinspezifischen Antikörper inkubiert; dieser wird ebenfalls in Milch verdünnt (Hybridoma-Überstände 1:100, monoklonale Antikörper 1:3.000 bis 1:20.000). Um eine gleichmäßige Verteilung der Antikörpersuspension auf der Membran zu gewährleisten, wird diese nach Zugabe des Antikörpers für 1-2 Stunden auf einem Schwenkbrett bei 120 upm geschüttelt. Daran schließt sich ein intensiver Waschvorgang an: 3× kurz, 1× 15 min in in PBS / 0,1 % Tween 20 (ebenfalls auf einem Schwenkbrett bei 120 upm). Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Nun erfolgt die Behandlung mit dem speziesspezifischen Antikörper in gleicher Weise, für 1 Stunde, wiederum gefolgt vom oben dargelegten Waschvorgang.

Für die nun folgende Detektion der Proteine wird das ECL-Verfahren („Enhanced Chemoluminescence“) verwendet. Supersignal West Ultra (Pierce; als 1:1-Gemisch der Komponenten A (Luminol/Enhancer-Lösung) und B (Peroxidlösung)) wird auf die Membran gegeben, welche dann in einen Polyethylen-Beutel eingeschweißt wird. Durch die anschließende Exposition und Entwicklung eines für die Wellenlänge $\lambda = 425 \text{ nm}$ empfindlichen Films (Kodak Biomax MR) kann die spezifische Antikörperreaktion mit den Proteinen sichtbar gemacht werden.

3.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration werden zwischen 5 μl Zellysat in eine Küvette pipettiert und anschließend mit 1 ml des Bradford-Reagenzes (BioRad; 1:5 verdünnt) versetzt. Nach Messung der Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ erfolgt entweder ein Abgleich der Proben nach relativem Proteingehalt oder eine Berechnung nach der Formel:

$$\text{Proteinkonzentration (mg / ml)} = \frac{\text{Extinktion bei } \lambda = 595 \text{ nm}}{0,059 \text{ ml/mg}}$$

3.3. Assays

3.3.1. Luziferase-Assay

Um die Transkriptionsaktivierung in eukaryontischen Zellen zu untersuchen, werden Luziferase-Assays durchgeführt. Dazu werden die Zellen in Sechskammer-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit einem Reporterplasmid transfiziert, welches das Gen für das Enzym Luziferase unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors exprimiert. Die hier eingesetzte Luziferase enthält eine Punktmutation, wodurch sie im Zytoplasma lokalisiert ist (Clontech). Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Promotoren handelt es sich um den p53-responsiven Anteil des *mdm2*-Promotors („BP100“), den Promoter des *Survivin* Gens (pSurvivinLUC und Mutationen hiervon) und den pGL3-Vektor (Promega) mit einem minimalen Promoteranteil, welcher konstitutiv aktiv ist. Diese Konstrukte können entweder

alleine in Zellen eingebracht (Untersuchung der basalen Aktivität des Promotors in der jeweiligen Zelllinie) oder zusammen mit einem Effektor kotransfiziert werden, dessen Auswirkung auf die Aktivierung des Promotors untersucht werden soll. Bereits 24 h nach Transfektion der Zellen kann die Analyse der Luziferaseaktivität erfolgen.

Dafür werden die Zellen zunächst in das vorhandene Medium abgeschabt und in einem Reaktionsgefäß bei 800×g für 5 min bei RT pelletiert. Das erhaltene Zellsediment wird in Reporter Lysis Buffer (Promega; 150 µl Puffer pro Kammer einer Sechskammer-Schale) resuspendiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Bei dieser Methode bleiben die Zellkerne intakt. Nach erfolgter Lyse werden die Zellkerne und Organellen durch Zentrifugation bei 15.000×g und 4 °C für 2 min vom Zytoplasma abgetrennt, welches anschließend im Reporter-Assay eingesetzt werden kann. Je 20 µl der Lysate werden dazu in 96-Loch-Mikrotiterplatten gegeben und in einem Luminometer (LUMIstar; BMG LabTechnologies) mit je 100 µl Substrat (Promega; siehe Kap. 2.5) versetzt. Die gemessene Chemolumineszenz wird an einem PC mit der Software LUMIstar 3.00-0 und dem Programm Microsoft Excel ausgewertet. Anschließend wird die Gesamtproteinmenge der Lysate durch einen Test nach Bradford (siehe Kapitel 3.2.3) bestimmt, und die erhaltenen Fluoreszenzwerte werden dementsprechend abgeglichen.

3.3.2. RT-PCR-Assay

Um das Verhältnis von verschiedenen mRNA-Spezies in unterschiedlich behandelten oder infizierten Zelllinien bestimmen zu können, wird ein RT-PCR-Assay durchgeführt. Aus Zellen isolierte mRNA wird durch Zugabe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase („Reverse Transkriptase“, aus dem Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV) revers transkribiert, anschließend erfolgt die Amplifikation der erhaltenen DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Als erstes wird die Gesamt-RNA (inklusive mRNA) der zu untersuchenden Zellen isoliert. Die Zellen werden abgeschabt, in einem Reaktionsgefäß mit 1000×g bei 4°C pelletiert, mit PBS^{def} gewaschen und anschließend mit 1 ml Trizol überschichtet (alle Angaben beziehen sich auf eine Kammer einer Sechskammerschale), gefolgt von einer Inkubation bei RT für 10 min. Nach Abschaben der Zellen in das Trizol werden

200 µl Chloroform je Milliliter Trizol zugesetzt und beide Substanzen durch mind. 15sekündiges Schütteln gut durchmischt. Es folgt eine 3minütige Inkubation bei RT und eine Zentrifugation bei 15.000×g / 4 °C für 15 min. Die wäßrige (obere) Phase wird in ein neues Gefäß transferiert und mit 500 µl Isopropanol je Milliliter ursprünglichem Trizol-Volumen versetzt. An das kräftige Mischen der Lösung schließt sich eine erneute Inkubation bei RT für 10 min an. Es folgt das Sedimentieren der RNA mittels Zentrifugation (15 min bei 15.000×g / 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wird das Sediment in 70%igem Ethanol resuspendiert (1 ml je Milliliter Trizol-Vol.) und erneut zentrifugiert (wie oben). Der Überstand wird entfernt und das Sediment etwa 5 min an der Luft getrocknet. Dann wird es in 20 - 100 µl RNase-freiem Wasser (Ambion) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Vor der reversen Transkription wird die RNA-Konzentration bestimmt (analog Kap. 3.4.2.3) und die Qualität der Präparation mittels Auftrennung in einem analytischen Agarosegel (Kap.3.5.1) überprüft. Danach erfolgt die Reaktion mit folgendem Ansatz:

präparierte RNA	0,5 bis 2 µg
Primer (12,5 ng/µl)	1 µl
nukleasefreies H ₂ O	ad 12 µl

Bei dem verwendeten Primer handelt es sich um jeweils Gen-spezifische Oligonukleotide, deren Sequenzen unter XXX zusammen mit den Sequenzen für hin und rück-Primer aufgelistet sind. Dieser Ansatz wird 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort für wenigstens 1 min auf Eis gestellt, um die RNA zu denaturieren. Es folgt die Zugabe folgender Reagenzien:

5× Erststrang-Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
	Σ = 20 µl

Nach 2 Minuten bei 42 °C wird 1 µl der RNA-abhängigen DNA-Polymerase zugefügt (Superscript II), gefolgt von einer weiteren Inkubation bei gleichbleibender

Temperatur für 50 min. Durch 15minütiges Erhitzen auf 70 °C erfolgt die Inaktivierung des Enzyms, danach wird der Ansatz auf Eis gelagert.

Es folgt die PCR-Amplifikation (Kap. 3.4.5) dieser cDNA mit Gen-spezifischen Primern. Nach Abschluß der PCR werden die Proben mit 2 µl DNA-Laufpuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (Kap. 3.5.1).

3.4. Arbeiten mit Plasmid-DNA

3.4.1. Transformation von *E.coli*

3.4.1.1. Herstellen kompetenter Zellen

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterien verläuft unter natürlichen Bedingungen nicht sehr effizient. Daher müssen die Bakterien vor der Transformation zunächst für die Aufnahme von Plasmid-DNA vorbereitet werden (Chung *et al.*, 1989). Im vorliegenden Fall werden die Bakterien durch die TSS-Puffer-Methode (Chung und Miller, 1988) kompetent gemacht. Dazu werden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH10B angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag werden 100 ml LB-Medium mit dieser Kultur (entsprechend 5 % (v/v)) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Damit wird sichergestellt, daß sich die Zellen in der exponentiellen Phase befinden. Die Bakterien lagern dann für 20 Minuten auf Eis und werden anschließend für 10 Minuten bei 2.000×g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml steril filtrierter „Transformation and storage solution“ (TSS; Kap. 2.3) aufgenommen und die Suspension für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien können sofort für die chemische Transformation verwendet oder, nach Zugabe von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 %, bei -80 °C gelagert werden.

3.4.1.2. Chemische Transformation von *E. coli*

Für die Aufnahme von Plasmiden in *E. coli* (Transformation) wird die Hitzeschock-Methode verwendet. Um für eine Anlagerung der DNA an die bakteriellen Zellen zu sorgen, werden zunächst 1 µl Plasmid-DNA ($c \leq 100$ ng/µl) zusammen mit 100 µl

kompetenten Zellen (siehe 3.4.1.1) in bereits gekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden, um eine Aufnahme der DNA in die Zellen zu erleichtern und anschließend eine weitere dreiminütige Inkubation auf Eis. Im Falle einer Kanamycin-Selektion (ein Inhibitor der 30S-ribosomalen Untereinheit) erfolgt nun die Zugabe von 800 µl vorgewärmtem LB-Medium und eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C, um die auf dem Plasmid kodierte Resistenz zu induzieren (entfällt bei Ampicillin, einem Inhibitor der Zellwandsynthese, der nur auf wachsende Zellen wirkt). Es schließt sich nun eine Zentrifugation bei 1.200×g für 3 min an. Das Bakterienpellet wird anschließend in 100 µl LB-Flüssigmedium aufgenommen, auf Agarplatten (Kanamycin: 50 µg/ml; Ampicillin: 200 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.4.1.3. Elektroporation von *E.coli*

Bei dieser besonders effizienten Methode zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien darf nur eine geringe Menge DNA eingesetzt werden: 0,5-1 µl DNA ($c < 10$ ng/µl) werden in eine auf 4 °C gekühlte Elektroporationsküvette (Plattenabstand 0,1 cm) gegeben und anschließend mit 10 µl elektrokompenten *E. coli* (ElektroMAX DH10B; Life Technologies) gemischt.

Nun wird für ca. 5 ms ein elektrisches Feld angelegt (1,7 kV, 200 Ω, 25 µF). Nach erfolgreicher Transformation werden sofort 100 µl LB-Medium zugegeben. Auch in diesem Fall schließt sich bei einer Kanamycin-Selektion zunächst eine einstündige Inkubation bei 37 °C an (Resistenzbildung). Der Ansatz wird dann auf LB-Agarplatten, welche das benötigte Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) enthalten, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.4.2. DNA-Isolation und Quantifizierung

Für alle DNA-Präparationen werden Kits der Firma Qiagen verwendet. Um 5 ml-Kulturen von *E.coli* zu erhalten, werden von LB^{Amp}-Agarplatten (siehe 3.4.1.2) Klone gepickt und in Flüssigmedium (2YT oder LB mit den Antibiotika Ampicillin (200 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml)) über Nacht angezogen. Diese Kulturen werden nun entweder direkt für Mini-Präparationen verwendet oder zum Animpfen von 250 ml-

Kulturen für Maxi-Präparationen benutzt. Beide Isolationsverfahren basieren auf der modifizierten Alkali-Lysis-Methode (Birnboim und Doly, 1979) sowie der Adsorption von DNA an Silicat-Matrizes in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Nach jeder DNA-Präparation werden die isolierten Plasmide durch Verdau mit geeigneten Endonukleasen (Bildung eines charakteristischen Musters) auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.4.2.1. Mini-Präparationen

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wird mit Qiagen Spin Miniprep Kits durchgeführt. Nach Anzucht von 5 ml-Kulturen von *E.coli* über Nacht in 2YT oder LB mit den entsprechenden Antibiotika erfolgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1.200×g und 4 °C. Die Pellets werden dann in einem RNase-haltigen Puffer aufgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert. Es folgt die Lyse der Zellen unter alkalischen Bedingungen und Anwesenheit von SDS. Nach der Neutralisation wird durch eine Zentrifugation bei 10.000×g für 10 Minuten ein Präzipitat aus chromosomaler DNA, Zellbestandteilen, Proteinen und SDS von der löslichen Plasmid-DNA abgetrennt. Die Überstände mit der Plasmid-DNA werden anschließend auf Säulen gegeben und die DNA durch Zentrifugation (Qiagen Spin Kit; 1 min bei 10.000×g / 4 °C) an die Säulenmatrix gebunden. Nach Waschen der Säulen mit PE-Puffer (im Kit enthalten) erfolgt die Elution der Plasmid-DNA mit 50 µl (Qiagen Spin Kit) EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen) und die Lagerung bei -20 °C.

3.4.2.2. Maxi-Präparationen

Präparationen von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgen mittels Qiafilter Maxi Kit. Dafür werden zuerst Übernacht-Kulturen von *E.coli* (250 ml) in LB oder 2YT mit dem jeweiligen Antibiotikum (siehe Kap. 3.4.2.1) bei 6.000×g / 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Aufnahme der Pellets in einem RNase-haltigen Puffer sowie Lyse unter den oben genannten Bedingungen (Kap. 3.4.2.1) erfolgt die Neutralisation des Lysats. Anschließend wird dieses durch einen Filter gepreßt (Entfernung von Präzipitaten), auf eine vorher equilibrierte Säule aufgetragen und die lösliche Plasmid-DNA somit an die Säulenmatrix gebunden. Nach Waschen der Säule und

Elution der Plasmid-DNA mittels vorgeschriebenen Puffern wird die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000×g / 4 °C präzipitiert. Das Pellet wird zum Waschen mit 300 µl 70 % Ethanol überspült und nach dem Trocknen an der Luft direkt in 300 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen) aufgenommen.

3.4.2.3. Quantifizierung

Die Quantifizierung der aus den Plasmid-Präparationen gewonnenen DNA wird über photometrische Messungen erreicht. Nach Verdünnung (1:100 und 1:200) in bidestilliertem Wasser erfolgt die Messung der Extinktion bei 260 nm mit einem GeneQuantII-Photometer (Pharmacia Biotech). Dabei entspricht eine Extinktion (E_{260}) von 1 etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Quantifizierung von (einzelssträngiger) RNA erfolgt analog zur beschriebenen DNA-Messung. Hierbei entspricht eine Extinktion (E_{260}) von 1 etwa 40 µg/ml RNA.

3.4.3. Fällung von DNA

Um DNA aus einer Lösung zu präzipitieren wird zunächst 0,5-1 µl Glycogen (10 mg/ml) als Trägermolekül zugegeben. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,2) wird die Lösung gut gemischt (Bindung der DNA an das Glycogen), anschließend werden 2,5 Volumenteile eiskalter Ethanol zugefügt. Daran schließt sich eine Zentrifugation für 30 min bei 10.000×g / 4 °C an. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 70 % kalten Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Bedingungen wie oben) für 30 min und Abnahme des Überstandes wird die DNA an der Luft getrocknet. Soll die DNA anschließend für eine Elektroporation verwendet werden, wird sie in einem 1:3-Gemisch aus EB-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen) und H₂O bidest. aufgenommen, andernfalls in reinem EB-Puffer.

3.4.4. Restriktionsverdau von DNA

Das Schneiden der DNA erfolgt über Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB). Bei doppelten Verdauen erfolgt die Inkubation in einzelnen Fällen über Nacht, wenn aufgrund von Differenzen in der Pufferzusammensetzung keine optimalen Bedingungen gegeben sind. Soweit nicht anders angegeben, enthält ein üblicher Ansatz folgende Komponenten:

DNA	1 µg
10x Reaktionspuffer	1 µl
Enzym (10 U/µl)	1 µl
10× BSA (Rinderserumalbumin)	1 µl
H ₂ O bidest.	ad 10 µl

Die Ansätze werden für 1 Stunde (oder über Nacht) inkubiert. Von einigen Enzymen wird Rinderserumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml benötigt; es stört jedoch in keinem Fall den Restriktionsverdau. In analytischen Ansätzen mit nicht quantifizierter DNA aus Mini-Präparationen werden jeweils 2 µl (von insgesamt 50 µl) oder 3 µl (von 100 µl) der eluierten DNA eingesetzt.

3.4.5. Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Die dabei verwendeten Start-Oligonukleotide, welche das zu synthetisierende DNA-Fragment begrenzen, werden im weiteren als „Primer“ bezeichnet.

Das Zyklusprotokoll wird mit einem GeneAmp 2400 PCR System (Perkin Elmer) durchgeführt; ein exemplarischer 100 µl-Ansatz enthält folgende Komponenten:

Matrizen-DNA (300 ng/μl oder RT-Ansatz)	1 μl
3'-Primer (50 ng/μl)	7 μl
5'-Primer (50 ng/μl)	7 μl
10x Reaktionspuffer	5 μl
dNTP-Mix (20 mM)	1 μl
H ₂ O bidest.	28,6 μl
<i>HiFi</i> DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	0,375 μl
	Σ = 50 μl

Zyklus-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96 °C	3 min
2	20-35	96 °C	30 sec
		57 °C	30 sec
		70 °C	50 sec
3		4 °C	∞

für UbiquitinC wird ein abgeänderter Zyklus benutzt:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96 °C	3 min
2	20-30	96 °C	30 sec
		70 °C	50 sec
3		4 °C	∞

Anschließend werden die PCR-Produkte über ein analytisches Agarosegel aufgetrennt und dieses photographiert.

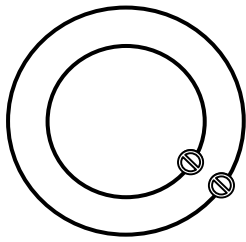
3.4.6. Mutagenese

3.4.6.1. Entwerfen der Mutagenese-Oligonukleotide

Die zielgerichtete Mutagenese erfolgt mittels QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Dazu werden zunächst je Mutante zwei Mutagenese-Oligonukleotide (Primer) entworfen, welche die gewünschten Mutationen enthalten. Dabei werden folgende Regeln berücksichtigt:

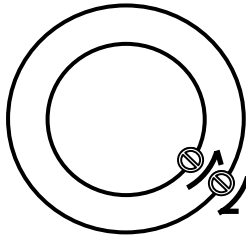
- 1) die Primer sollten eine Länge von etwa 25-45 Nukleotiden besitzen und die Schmelztemperatur¹ (T_m) sollte bei $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ liegen:
$$T_m = [81,5 + 0,41 \cdot (\% \text{ GC}) - 675/N - (\% \text{ Fehlpaarungen})] ^{\circ}\text{C}$$
 (N = Basenanzahl des Primers)
- 2) links und rechts von den gewünschten Mutationen sollten noch jeweils etwa 10-15 komplementäre Basen vorhanden sein
- 3) Basenzusammensetzung:
 - (a) der GC-Gehalt sollte mindestens 40 % betragen
 - (b) für optimale Ergebnisse sollten die Primer in einem oder mehreren G oder C enden
- 4) bei der Mutagenese-Reaktion sollten die Primer im Überschuß vorhanden sein
- 5) um eine spätere Identifizierung korrekter Klone zu erleichtern, sollte mit dem Mutagenese-Primer eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym eingefügt oder deletiert werden

¹ Formel entnommen aus dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual



1. Plasmid-Präparation:

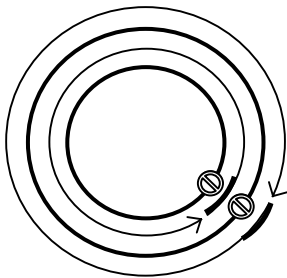
Plasmid mit dem gewünschten Gen und dem Zielpunkt der Mutagenese ()



2. Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese

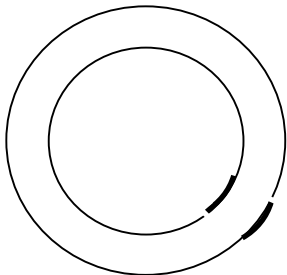
2a. Denaturierung und Anlagerung:

Nach dem Denaturieren des Plasmids folgt die Anlagerung der Oligonukleotide () mit der gewünschten Mutation



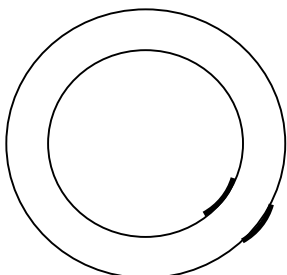
2b. Elongation:

Durch die *Pfu* Turbo DNA-Polymerase erfolgt die Elongation der Oligonukleotide, was schließlich zu zirkulären Strängen mit einem Bruch im Zuckerphosphatgerüst führt



3. Verdau:

Die methylierte parentale DNA (ohne Mutation) wird mit dem Enzym *DpnI* verdaut



4. Transformation:

Nach der Transformation von *E. coli* DH10B werden die Strangbrüche durch bakterielle Enzyme repariert

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der QuickChange-Mutagenesemethode (verändert aus QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual, Stratagene).

3.4.6.2. Mutagenese-Reaktion

Mutagenese-Reaktionen werden mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene durchgeführt (Schema siehe Abbildung 3.1). Dabei handelt es sich im wesentlichen um eine Oligonukleotid-vermittelte Mutagenesemethode: Die parentale Plasmid-DNA wird zunächst durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Es folgt eine Anlagerung der Mutagenese-Oligonukleotide (Primer) an die DNA-Stränge durch Abkühlung auf 55 °C und die Elongation der Primer durch die *Pfu* Turbo DNA-Polymerase bei 68 °C (diese Polymerase wird verwendet, weil sie eine Korrekturlesefunktion und daraus resultierend eine 6fach niedrigere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase hat (Cline *et al.*, 1996)). Durch häufige Wiederholung dieses Vorgangs amplifiziert man automatisch ein Plasmid, welches die gewünschte Mutation enthält.

Der in einem GeneAmp 2400 PCR System von Perkin Elmer amplifizierte Ansatz enthält folgende Komponenten:

10x Reaktionspuffer	5 µl
Matrizen-DNA (50 ng/µl)	1 µl
5'-Primer (50 ng/µl)	2,5 µl
3'-Primer (50 ng/µl)	2,5 µl
dNTP-Mix (20 mM)	0,5 µl
H ₂ O bidest.	38,5 µl
	Σ 49 µl
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

Zyklus-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	30 sec
2	25	95 °C	30 sec
		55 °C	1 min
		68 °C	10 min (2 min/kBp)
3	1	4 °C	∞

Nach Abkühlung des Ansatzes auf 37 °C schließt sich eine Behandlung mit der *DpnI*-Endonuklease an (Zugabe von 2 µl Enzym und Inkubation bei 37 °C für 1 h). Diese Endonuklease mit der Zielsequenz 5'-G^{m6}ATC-3' ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA. Da Plasmid-DNA, welche aus *E.coli* DH10B stammt, *dam*-methyliert ist (und damit sensitiv gegenüber *DpnI*-Verdau), erfolgt auf diese Weise der Verdau der parentalen DNA, während die mutierte DNA erhalten bleibt. Nach Fällung des Mutagenese-Produktes (Kap. 3.4.3) und Transformation (Kap. 3.4.1.3) von *E.coli* DH10B („ElektroMAX DH10B“, Life Technologies) werden diese auf Agarplatten (mit Selektions-Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den erhaltenen Kolonien werden ca. 16 Klone gepickt und nach Mini-Präparation der Plasmid-DNA (Kap. 3.4.2.1) erfolgt die Identifizierung korrekter Klone durch einen Restriktionsverdau (siehe Regel 5 in Kap. 3.4.6.1). Daran schließt sich noch die Sequenzierung der Plasmid-DNA an, um unerwünschte Punktmutationen auszuschließen (Kap. 3.4.7).

3.4.7. Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der modifizierten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977), welcher folgendes Prinzip zugrunde liegt: Als erstes wird eine Polymerisationsreaktion durchgeführt, bei der neben den zur Elongation des DNA-Stranges notwendigen Desoxynukleotiden (dNTPs) in geringerer Menge auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt werden. Dadurch kommt es immer wieder zu Kettenabbrüchen, da nach Einbau von ddNTPs in die DNA keine 3'-Hydroxylgruppe mehr für die weitere Polymerisation zur Verfügung steht. Man erhält

DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die anschließend im elektrischen Feld aufgetrennt werden (Gelelektrophorese). Mittels unterschiedlicher fluoreszierender Gruppen an den ddNTPs können diese nach Anregung durch einen Laser unterschieden werden. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit der unterschiedlichen DNA-Fragmente ergibt sich dann die Sequenz.

3.4.7.1. Polymerase-Reaktion

Vor der Gelelektrophorese wird zunächst die Polymerase-Reaktion mit dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs durchgeführt. Ein Ansatz enthält folgende Komponenten:

Terminationsmix	4 µl
DNA aus Mini-Präparationen (1-2 µg)	3 µl
Sequenzier-Primer (100 ng/µl)	1 µl
H ₂ O bidest.	ad 20 µl

Der Terminationsmix (Perkin Elmer) enthält die *AmpliTaq* DNA-Polymerase FS mit einer thermostabilen Pyrophosphatase. Hierbei handelt es sich um eine Variation der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) mit zwei Punktmutationen, welche den Einbau von Didesoxynukleotiden erleichtern und die 5'→3'-Nukleaseaktivität fast vollständig inhibieren. Weitere Bestandteile sind dNTPs (dATP, dCTP, cITP, dUTP), ddNTPs (jeweils mit Dichlororhodamin und einem spezifischen Fluoreszenzmarker gekoppelt) und Magnesiumchlorid in Tris-HCl-Puffer pH 9,0. Der Ansatz durchläuft 25 Zyklen in einem GeneAmp 2400 PCR System von Perkin Elmer mit folgenden Parametern:

Zyklus-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96 °C	2 min
2	25	96 °C	10 sec
		50 °C	5 sec
		60 °C	4 min
3	1	4 °C	∞

Die Produkte der Sequenzier-Reaktion werden anschließend gefällt (Kap. 3.4.3). Nach dem Waschen und Trocknen des Pellets wird die DNA in 4 µl Formamid-EDTA-Dextranblau-Probenpuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel (3.5.3) werden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

3.4.7.2. Sequenzierung

Die elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen Fragmente erfolgt mit einem automatisierten Sequenziergerät, dem Abi Prism 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer). Die Durchführung ist in Kapitel 3.5.3 beschrieben. Daran anschließend werden die Daten mit der Abi Prism-Software (für Apple Macintosh) ausgewertet.

3.5. Elektrophoretische Methoden

3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer Größe in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration elektrophoretisch aufgetrennt werden. Für die im Verlauf dieser Arbeit durchzuführenden Gelelektrophoresen werden, abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, 0,8-2%ige Agarosegele mit einem Ethidiumbromid-Gehalt von 0,1 µl/ml einer 1%igen Stammlösung verwendet. Die DNA-Proben werden mit einer entsprechenden Menge 6× Probenpuffer versetzt und

auf das Gel aufgetragen. Zum Vergleich werden 2 µl oder 4 µl eines geeigneten DNA-Längenstandards aufgetragen. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung (meist ≈ 1 Stunde) bei einer konstanten Spannung von 115 V (entsprechend 7 V/cm) wird das Ergebnis unter UV-Licht mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

3.5.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen werden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele verwendet. Bei dieser Methode versieht das Natriumdodecylsulfat (SDS) die Proteine mit einer einheitlichen negativen Ladung, so daß ihr Laufverhalten bei einer Auftrennung im elektrischen Feld nicht mehr durch eine variierende Ladung beeinflusst wird, sondern nur noch von ihrer Größe (und Konformation) abhängt. Aufgrund der negativen Ladung wandern die Proteine von der Kathode zur Anode. Das Gießen der Gele erfolgt folgendermaßen:

Zusammensetzung Trenngel (10 %)

30%ige Polyacrylamidlösung	3,4 ml
1,5 M Tris pH 8,8 mit SDS	2,6 ml
H ₂ O bidest.	3,9 ml
10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS)	50 µl
TEMED	7,5 µl

Nach dem Gießen erfolgt die Überschichtung mit 100 % Isopropanol für die Dauer der Polymerisation ($\approx \frac{3}{4}$ h), um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Nun schließt sich das Gießen des Sammelgels und Einsetzen des Kammes an, um die Taschen zu generieren.

Zusammensetzung Sammelgel (4,5 %)

30%ige Polyacrylamidlösung	750 µl
0,5 M Tris pH 6,8 mit SDS	1,3 ml
H ₂ O bidest.	2,9 ml
10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS)	50 µl
TEMED	5 µl

Nach dem Einbau des polymerisierten Gels in eine Kammer sowie Zugabe des Laufpuffers für SDS-PAGE (Zusammensetzung siehe 2.3) wird der Kamm entfernt und die Taschen mit Puffer gespült, um nicht polymerisierte Gelreste zu entfernen. Es folgt das Auftragen der Proben, welche durch Erhitzen (5 min bei 95 °C) denaturiert werden. Zur Abschätzung der Proteingröße wird der Längenstandard Rainbow Markers RPN756 (Amersham) verwendet. Der Gellauf vollzieht sich bei einer konstanten Spannung von zunächst 80 V (zum Einlaufen der Proteine ins Sammelgel) und anschließend 150 V, bis eine optimale Auftrennung der zu untersuchenden Proteine erreicht ist.

3.5.3. Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenziergel

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten aus der Sequenzier-PCR (Kap. 3.4.7) werden zwei verschiedene Gele verwendet. Vor dem Gießen des jeweiligen Sequenziergels erfolgt das Reinigen der Glasplatten mit einer 1%igen Lösung des Detergenz Alconox (Aldrich Chemical Company) in destilliertem Wasser, 70 % Isopropanol sowie abschließend mit reinem destilliertem Wasser. Anschließend wird die Gelapparatur zusammengebaut und das Gel gegossen:

5%iges Polyacrylamidgel:

Harnstoff	21,0 g
30%ige Acrylamidlösung	8,4 ml
10x TBE	6,0 ml
H ₂ O bidest.	20,0 ml

4,5%iges Polyacrylamidgel:

Harnstoff	18,0 g
30%ige Acrylamidlösung	7,5 ml
10x TBE	6,0 ml
H ₂ O bidest.	23,0 ml

Der Harnstoff wird durch ca. 30minütiges Rühren gelöst. Anschließend erfolgt eine Filtration durch einen 0,2 µm-Filter. Zum Starten der Polymerisationsreaktion werden 300 µl frisch angesetztes 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und 20 µl

Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben und das Gel in die Gießvorrichtung gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 1-2 Stunden werden mit einem Haifischkamm die Taschen generiert und das Gel in das Sequenziergerät (Abi Prism; Kap. 3.4.7.2) eingebaut. Die Oberfläche der Glasplatten wird dann mit dem Laser auf Verschmutzungen überprüft. Nach Einfüllen des Laufpuffers (1x TBE; siehe 2.3) in die obere und untere Pufferkammer wird das Gel mittels 20minütigem Vorlauf auf die Betriebstemperatur von 51 °C gebracht. Um ein Vermischen der Proben zu verhindern, erfolgt das Beladen des Gels in 2 Stufen. Zunächst wird jede zweite Tasche des Gels mit 2 µl des Sequenzieransatzes beladen; dann wird für ca. 2 Minuten Spannung angelegt, um die Proben einlaufen zu lassen. Nach Beladen der restlichen Taschen folgt der Start des Laufs, wobei die Laufzeit 8 h für das 5%ige und 4 h für das 4,5%ige Gel beträgt. Mittels eines Argon-Ionenlasers werden die Daten während der Elektrophorese aus jeweils einer Spur pro Sequenzierprobe detektiert und mit Hilfe der Abi Prism-Software (für Apple Macintosh) ausgewertet (siehe 3.4.7.2).

3.6. cDNA Microarrays

Die Expression zellulärer Gene während der Adenovirusinfektion wurde mit der Methode der cDNA-Microarrays analysiert. Das experimentelle Prozedere wird beschrieben in Übereinstimmung mit den Richtlinien "minimum information about microarray experiment (MIAME)" (Brazma et al., 2001).

$1,4 \times 10^7$ HeLa Zellen wurden mit Adenovirus Typ 5, dl309 mit einer Moi von 10 infiziert. Die Detektion des adenoviralen Proteins E2A in separat durchgeführter Immunfluoreszenz zeigt, daß mit dieser Virusmenge 100% der Zellen infiziert wurden. Parallel wurde die gleiche Anzahl mock- infizierter Zellen analysiert. 24h nach der Infektion wird die RNA in beiden Ansätzen geentet. In einem zweiten Experiment werden weitere zwei Flaschen mit dl309, bzw. mock-infiziert. Nach dem selben Protokoll jedoch unabhängig vom ersten Ansatz wurde RNA geerntet. Jede dieser vier RNA-Proben wird nun revers transkribiert und dabei durch Inkorporation von Fluoreszenz-gekoppelten Nukleotiden markiert. Es wurden vier Microarrays an zwei verschiedenen Tagen hybridisiert. An jedem Tag wird ein sogenanntes "dye-

swap" oder "cross-color" Experiment durchgeführt. Da jede cDNA auf jedem Array zweimal gespottet ist, ergibt sich bei der Hybridisierung von vier Arrays eine achtmalige Hybridisierung je markierter cDNA.

3.6.1. Arraydesign

Auf Glas-Objekträger (Corning Inc., GAPSTM Amino silane coated slides, #2549) werden PCR-amplifizierte cDNA-Klone (Research Genetics) gespottet. Die verwendeten Klone wurden von der Firma Invitrogen/Research Genetics erworben (Serie GF200). Für die Amplifikation wurden die Primer M13 Reverse und M13 Forward (-20) (Invitrogen) verwendet. Die PCR-Produkte werden auf den Glassobjekträger aufgebracht, wobei jedes Produkt zweimal, jedoch in verschiedenen Regionen des Arrays gespottet wird.

3.6.2. Probenaufbereitung

RNA von dl309, bzw. mock infizierten HeLa Zellen wird mit TRIZOL isoliert. 50 µg RNA wurden zusammen mit 4 µg oligo dT-15 Primer in einem Gesamtvolumen von 37 µl auf 65°C erhitzt und nach 10 min auf RT abgekühlt. Die reverse Transkription wird mit dem Enzym Superscript II durchgeführt in der Anwesenheit von dATP, dTTP und dGTP (161µM pro Nukleotid) in einem Gesamtvolumen von 62µl. Nicht-markiertes dCTP (16 µM), sowie markiertes dCTP (16 µM) (gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 oder Cy5) waren ebenfalls anwesend. Nach einer Inkubations von 10 min bei 25 °C, erfolgt die reverse Transkription für 120 min bei 37°C. Anschließend werden die erhaltenen Polynukleotide durch Binden an eine Silica-Matrix aufgereinigt (PCR Purification Kit, Qiagen). Jeder Probe wurden vor der Ethanol-Fällung 10 µg humane cot1-DNA zugesetzt. Das Präzipitat wurde in 10 µM Tris-CL, pH 8.0 aufgenommen, für drei Minuten gekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zur weiteren Denaturierung wurde 200mM NaOH zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor wieder eine Ethanolfällung durchgeführt wurde. Das Präzipitat wird in 13 µl Wasser resuspendiert, dann erfolgt die Zugabe folgender Reagenzien:

5 μ l 20 x SSC

2 μ l 2% SDS

10 μ g Poly (dA)

Die entsprechenden Cy3, bzw. Cy5-markierten Proben werden nun vereinigt und für 2 min bei 95°C denaturiert, bevor sie auf den Microarray gegeben werden.

3.6.3. Hybridisierung

Die Microarrays werden 20 Minuten lang bei 56°C prähybridisiert in einer Lösung aus

1% BSA

3x SSC

0.1% SDS

Nach einem kurzen Waschen in destilliertem Wasser wird der Array kurz durch Zentrifugation getrocknet (1500xg, 2min). Die zu hybridisierende Probe wird behandelt wie oben beschrieben und dann möglichst luftblasenfrei auf den Array pipettiert. Der Array wird mit einem Plastikdeckgläschen abgedeckt und für mindestens 16 h bei 56°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre hybridisiert.

Nach Beendigung der Hybridisierung wird der Array gewaschen wie folgt. Jeder Waschschritt dauert 5 min und wird bei Raumtemperatur auf einem Schwenkbrett mit etwa 60 upm ausgeführt.

1. 1xSSC/0.1%SDS
2. 0.1xSSC/0.1%SDS
3. 0.1xSSC
4. H₂O bidest.

Der gewaschene Array wurde durch kurze Zentrifugation (1.500xg, 2 min) getrocknet, anschließend wurden sofort die Spotintensitäten gemessen.

3.6.4. Messung, Auswertung und Normalisierung

Die Messung der Spotintensitäten erfolgte mittels einer Laserquelle und eines Fluoreszenzdetektionsgerätes der Firma Genetic Micro Systems (Array Scanner Model #418). Matrizen zur Quantifizierung wurden erhalten durch Extraktion der einzelnen Spotintensitäten aus den erhaltenen Bildern mittels der ImaGene Software (BioDiscovery). Acht Punkte pro Gen wurden analysiert und ausgewertet, wobei jeweils uniniziert mit infiziert verglichen wurde. Da die Reverse Transkription zur der cDNA-Markierung mit einem oligo dT Primer durchgeführt wurde, konnten Gene ohne polyA tail (z.B. Histone) nicht weiter untersucht werden.

Für jeden Spot wurden nun die mittleren Signal-, bzw. Hintergrundintensitäten ermittelt. Um die Spot-Differenzen zu ermitteln, wurden die Hintergrund-korrigierten Werte der beiden Scan-Kanäle verrechnet. Der Referenz von Yang folgend (Yang et al., 2002), wurde das Verhältnis $M = \log_2 R/G$ und die mittlere log Intensität $A = \log_2((RG)^{0.5})$ benutzt, worin R und G die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach Subtraktion des Hintergrundes für den Farbstoff Cy3, bzw. Cy5 darstellen. Anschließend wurden die Daten standardisiert, um sowohl die je nach Farbstoff leicht unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten auszugleichen, als auch verschiedene Experimente miteinander vergleichen zu können. Zuerst wurde eine intensitätsabhängige Standardisierung wie bei Y. Yang beschrieben (Yang et al., 2002), durchgeführt, um die technischen Unebenheiten der einzelnen Arrays zu korrigieren (*lowess scatter-plott smother*). Im zweiten Schritt wurde eine globale Standardisierung ($M' = M - c$) angewendet, um das Zentrum der Log-Verhältnisse auf Null zu bringen. Weil jedes Gen zweimal auf jedem Array gespottet war und vier Arrays insgesamt hybridisiert wurden, wurden mittlere log-Verhältnisse errechnet. Zum Auffinden differentiell exprimierter Gene wurden die Gene nach der D-Statistik (Tusher et al., 2001) sortiert.

4 Ergebnisse

4.1 Negative Transkriptionsregulation durch p53

4.1.1 Das adenovirale Protein E1B-19kDa ist in der Lage, die p53-vermittelte Apoptose zu inhibieren, ohne die Repression von *Survivin* und *Stathmin* aufzuheben

Um die Frage beantworten zu können, über welchen Mechanismus sich die Repression von Genen wie *Stathmin* oder *Survivin* vollzieht, wurde der folgende experimentelle Ansatz gewählt: In H1299 Zellen, die kein endogenes p53 enthalten, wurde mittels zweier Adenoviren gleichzeitig p53 (zur Induktion der Apoptose) und das adenovirale Protein E1B-19kDa (ein starker Apoptoseinhibitor, (Sabbatini et al., 1995; Shen und Shen, 1994)) überexprimiert. Daran schlossen sich Untersuchungen des Grades der Apoptose, Isolation der Gesamt-RNA und RT-PCR-Analyse der betroffenen Gene, sowie von nicht durch p53 regulierten Kontrollgenen an.

4.1.1.1 Herstellung von Adenoviren, die den Apoptoseinhibitor E1B-19kDa überexprimieren

Um die Auswirkungen von p53 losgelöst vom Einsetzen der Apoptose untersuchen zu können, braucht man einen Inhibitor der Apoptose. Ein solcher Inhibitor ist das adenovirale Protein E1B-19kDa, das zu den stärksten bekannten Inhibitoren der Apoptose zählt.

Zur Expression von E1B-19kDa wurde das AdEasy-System (He et al., 1998) zur Herstellung rekombinanter Adenoviren verwendet. Ziel war es, mit Hilfe eines E1B-19kDa-exprimierenden Virus die Induktion von p53-vermittelter Apoptose zu inhibieren. Die für E1B-19kDa kodierende DNA wurde hierzu in einen Shuttle Vektor (pAdtrackCMV) hineinkloniert und nach Linearisierung durch PmeI-Verdau mit einem das gesamte restliche adenovirale Genom (mit Ausnahme der E1-Region) tragenden Vektor pAdEasy in *E. coli* (Stamm BJ5813) kotransformiert. In den BJ5813 Zellen kam es zur homologen Rekombination der beiden Plasmide an überlappenden

Genabschnitten. Daraus entstand das rekombinante Plasmid, das das *gene of interest*, in diesem Falle E1B-19kDa enthält. Auf demselben Plasmid befindet sich unter der Kontrolle eines CMV Promoters eine Expressionskassette für GFP, und das gesamte adenovirale Genom, mit Ausnahme der E1-Region. Dieses Plasmid wurde mit *PacI* linearisiert und in Zellen transfiziert, die die E1-Region des Adenovirus stabil exprimieren (911 Zellen). In diesen Zellen ist es den rekombinanten Viren möglich, sich zu replizieren. Die Effizienz der Transfektion und die Virusausbreitung konnten durch die GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. In Zellen, die effizient transfiziert worden waren, kam es zur Replikation des Virus und entsprechend zur Lyse der Zellen und damit zur Virusfreisetzung und Infektion der benachbarten Zellen. Dieser Vorgang wird begleitet vom Auftreten typischer "Kometen" im Zellrasen bei Betrachtung der grünen Fluoreszenz. Durch weitere Vermehrung der Viren in 911-Zellen entstand schließlich ein hochkonzentrierter Virusstock.

4.1.1.2 Überexpression des adenoviralen Proteins E1B-19kDa vermag auch in Gegenwart von p53 die Spaltung des Proteins Parp zu inhibieren

Um den Grad der induzierten Apoptose bestimmen zu können, wurde der Degradierungsstatus des Enzymes Poly-ADP-Ribose-Polymerase (Parp) via Western Blot analysiert. Parp ist ein 115kDa großes Protein, das während der Apoptose von der Caspase 3 gespalten wird. Dabei entstehen zwei Teilstücke: ein 85kDa und ein 25kDa großes Fragment. Der hier verwendete Antikörper erkennt sowohl die ungespaltene Form von Parp, als auch das 85kDa Fragment.

Für den folgenden Versuch wurden H1299 Zellen verwendet. Diese Zellen stammen aus einem humanen Lungenadenokarzinom und haben kein endogenes p53. Die Zellen wurden mit einem Adenovirus, das β -Galactosidase (Ad- β -Gal) oder E1B-19kDa (Ad-E1B-19k) überexprimiert, in Gegenwart oder Abwesenheit eines p53-exprimierenden Virus (Ad-p53wt), transduziert.

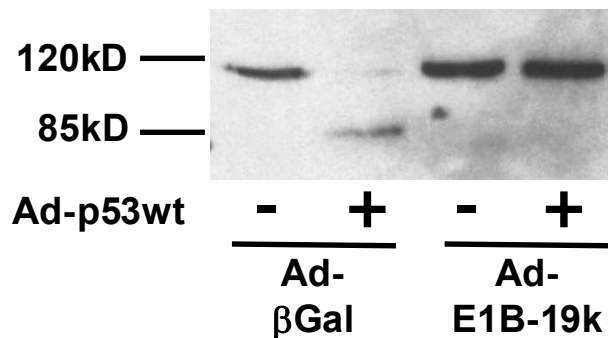


Abbildung 4.1: Menge und Degradierungsstatus des Proteins Parp. H1299 Zellen wurden mit Ad-E1B-19k und Ad- β -Gal infiziert (m.o.i.=200), in der Abwesenheit oder Gegenwart von Ad-p53wt (m.o.i.=100). 24h p.i. wurden die Zellen in RIPA geerntet. Es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulose-Membran und Nachweis mit Antikörpern gegen das Protein Parp. Ungespaltenes Parp hat eine Größe von 115kDa, während der Apoptose entsteht ein Fragment von 85kDa.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, zeigt sich im Western Blot in den Zellen, die nur mit Ad- β -Gal infiziert sind, ungespaltenes Parp mit einer Größe von 115kDa, d.h. die Zellen sind nicht apoptotisch. Ist Ad-p53wt zugegen, so verschwindet diese Bande und statt dessen zeigt sich eine tiefer laufende Bande bei 85kDa. Diese Bande ist aufgrund weiterer Proteolyse des Fragmentes ein wenig schwächer, was für ein fortgeschrittenes Stadium der Apoptose typisch ist. Diese Spaltung von Parp unterbleibt völlig, wenn die Zellen zusätzlich zu Ad-p53wt auch mit einem E1B-19kDa-exprimierenden Virus transduziert worden sind. In diesem Falle sind die Zellen nicht apoptotisch, obwohl p53 überexprimiert wird.

Aus diesen Beobachtungen kann der Schluss gezogen werden, dass E1B-19kDa fähig ist, die p53 induzierte Apoptose sehr effizient zu unterbinden.

4.1.1.3 Die Gene *Survivin* und *Stathmin* sind auch in Gegenwart von E1B-19kDa durch p53 reprimierbar

Durch Western Blot Detektion von Parp konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von E1B-19kDa sehr effektiv die p53-vermittelte Apoptose zu inhibieren vermag. Dadurch ist es nunmehr möglich, die Expressionslevel von *Survivin* und *Stathmin* losgelöst von der normalerweise durch p53 induzierten Apoptose zu analysieren, und somit die Frage zu beantworten, ob die Repression als Folge der Apoptose auftritt oder ein direkter Effekt von p53 ist.

Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden H1299 Zellen mit einem Adenovirus, das β -Gal (Ad- β -Gal) oder E1B-19kDa (Ad-E1B-19k) überexprimiert, transduziert, und zwar jeweils in Gegenwart oder Abwesenheit eines p53-exprimierenden Virus (Ad-p53wt). Um die Expressionslevel von *Survivin* und *Stathmin* auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurde vierundzwanzig Stunden nach der Infektion Gesamt-RNA isoliert und dann mit genspezifischen Primern revers transkribiert. Es folgte die Amplifikation eines Teilstückes der Gene. Die Hin-, bzw Rück-Primer hybridisierten im Bereich verschiedener Exons. Hierdurch wird eine Amplifizierung genomischer DNA vermieden.

Aus Abbildung 4.2 geht hervor, dass die mRNA Level von *Survivin* und *Stathmin* in Gegenwart von p53 signifikant reprimiert sind, während ein Kontrollgen (*Ubiquitin C*), nicht durch p53 Expression beeinflusst wird. *PIG3*, ein Gen, das durch p53 induziert wird, ist jeweils stark hochreguliert, wenn p53 zur Expression gebracht wurde, wodurch nachgewiesen ist, dass p53 transkriptionell aktiv war.

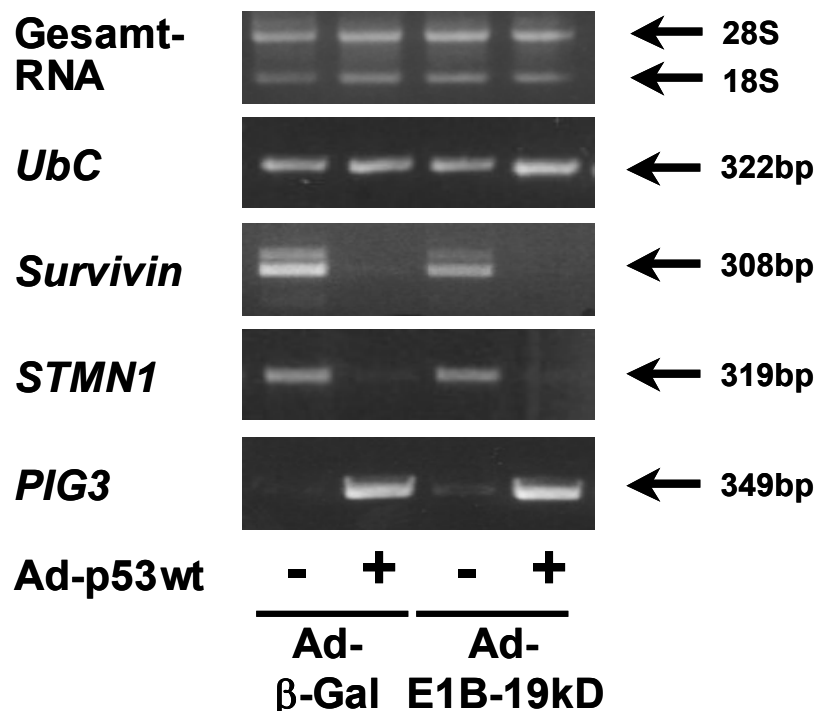


Abbildung 4.2: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Ubiquitin C* (*UbC*), *Survivin*, *Stathmin* (*STMN1*) und *PIG3*. 2×10^5 H1299 Zellen je Ansatz wurden mit den angegebenen Viruskombinationen transduziert. 48h p.i. wurde Gesamt-RNA präpariert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

Bemerkenswerterweise ändert die Gegenwart von E1B-19kDa nichts an der Repression von *Survivin* und *Stathmin* durch p53. Dies weist darauf hin, dass die Repression direkt von der Expression von p53 abhängt, aber völlig unabhängig vom Einsetzen der Apoptose ist.

4.1.1.4 Die Reprimierbarkeit des *Survivin*-Promoters ist nicht aufhebbar durch gleichzeitige Expression von E1B-19kDa

Von einigen Promotoren, wie z.B. dem 3'-*long terminal repeat* des Rous Sarcoma Virus, ist bekannt, dass sie in transienten Reporter-Assays durch die Anwesenheit von p53 reprimierbar sind. Diese Repression ist aber möglicherweise darauf zurückzuführen, dass p53 in den Zellen Apoptose auslöst, so dass als Epiphänomene der induzierten Apoptose die Repression verschiedener Gene beobachtet werden kann. Um einen unspezifischen Effekt dieser Art bei dem untersuchten *Survivin* Promoter ausschließen zu können, wurde zusätzlich zu einem p53-Expressionsplasmid auch der Apoptoseinhibitor E1B-19kDa in die Zellen transfiziert. Ist der Promoter von *Survivin* spezifisch p53-responsiv, so erwartet man durch Zugabe von E1B-19kDa keine Aufhebung der Repression. Ist aber die Repression nur ein Epiphänomen der Apoptose, so sollte sie durch die Anwesenheit von E1B-19kDa verschwinden.

Zum Vergleich wurde ein Luziferasereporterplasmid verwendet, das lediglich einen aus TATA-Box und Initiator-Region bestehenden Promoter trägt (*minimal promoter*, pGL3mp). Dieser Promoter ist nicht p53-responsiv.

Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen ist, lässt sich der wildtypische *Survivin*-Promoter durch p53 um ein mehr als Fünffaches reprimieren. Durch zusätzliche Expression von E1B-19kDa ist diese Repression nicht aufzuheben. Dies spricht dafür, dass p53 einen spezifischen Effekt auf den *Survivin*-Promoter hat, der in keiner direkten Verbindung zur durch p53 ausgelösten Apoptose steht. Die Expression des Luziferasekonstruktes unter der Kontrolle des *minimal promoters* hingegen zeigt ein p53- und E1B-19kDa- unabhängiges Bild.

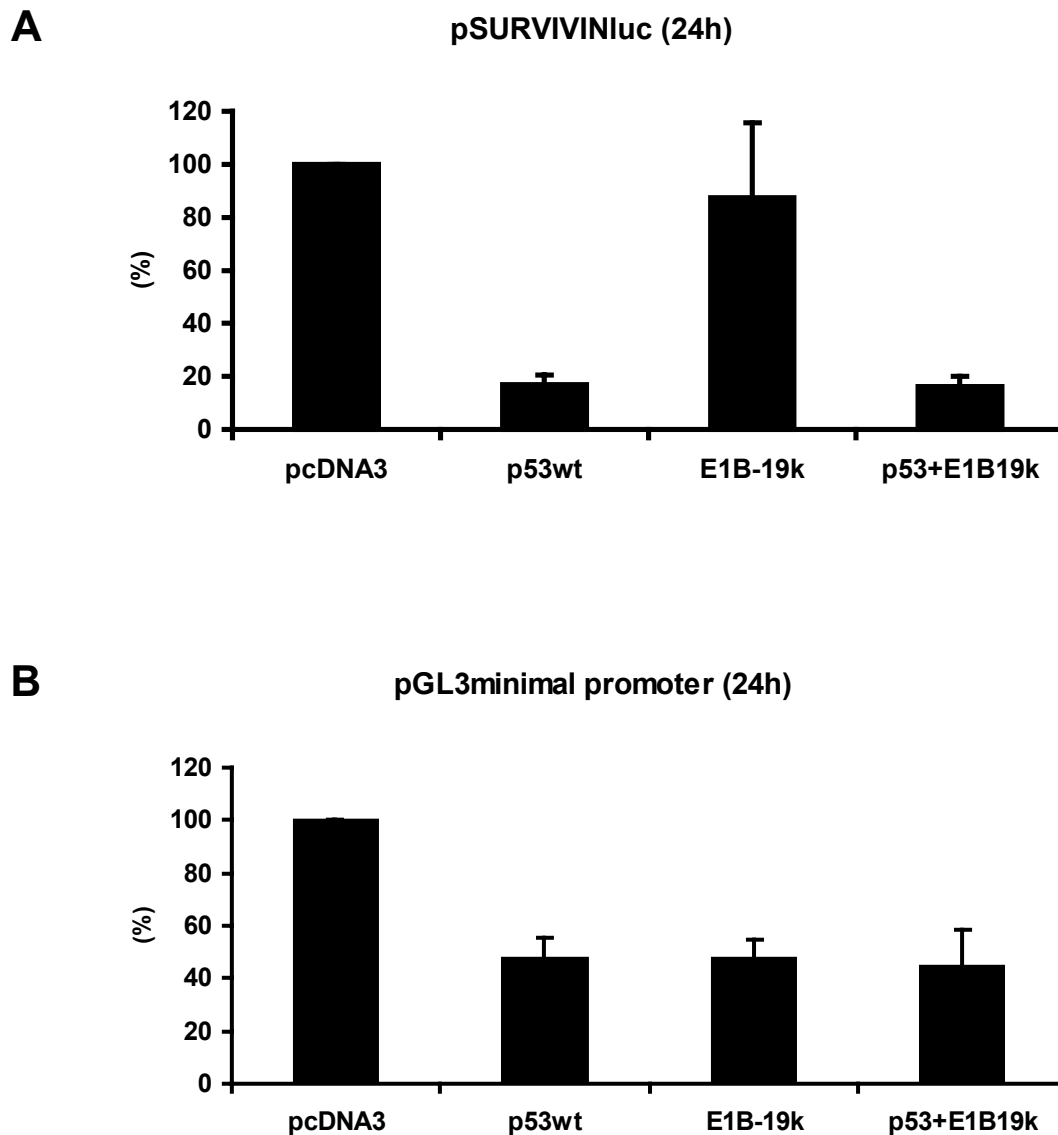


Abbildung 4.3: Aktivitäten zweier Luziferase-Reporterkonstrukte nach Transfektion mit p53- und E1B-19kDa-Expressionsplasmiden. 2×10^5 H1299 Zellen je Ansatz wurden mittels FuGene mit den angegebenen Expressionsplasmiden sowie mit Reporterplasmiden, die entweder den wildtypischen *Survivin*-Promoter oder einen sogenannten *minimal promoter* enthalten, transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und die Expressionshöhe der Luziferase anschließend durch Messung der Fluoreszenzintensität in einem Luminometer ermittelt. Die Werte sind relativ zur Aktivität des Reporters ohne p53-Expressionsplasmid dargestellt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (angegeben mit Standardfehler) (A) wildtypischer *Survivin*-Promoter (angeblich p53-responsiv), (B) pGL3mp mit einem nicht p53-responsiven *minimal promoter*.

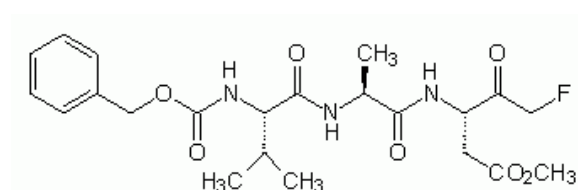
Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen ist, läßt sich der wildtypische *Survivin*-Promoter durch p53 um ein mehr als Fünffaches reprimieren. Durch zusätzliche Expression von E1B-19kDa ist diese Repression nicht aufzuheben. Dies spricht dafür, dass p53 einen spezifischen Effekt auf den *Survivin*-Promoter hat, der in keiner direkten Verbindung zur durch p53 ausgelösten Apoptose steht. Die Expression des

Luziferasekonstruktes unter der Kontrolle des *minimal promoters* hingegen zeigt ein p53- und E1B-19kDa- unabhängiges Bild.

Aus diesen Daten geht hervor, dass es sich bei der Repression des *Survivin*-Promoters durch p53 um einen sehr spezifischen Effekt von p53 handelt, der nicht durch die Anwesenheit eines Inhibitors der Apoptose zu unterbinden oder abzuschwächen ist.

4.1.2 Das Peptid Z-VAD ist ebenfalls fähig, die p53-induzierte Apoptose zu inhibieren, ohne die Repression von *Survivin* und *Stathmin* zu unterbinden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass E1B-19kDa nicht die p53 vermittelte Repression von *Survivin* und *Stathmin* verhindern konnte, stellte sich als nächstes die Frage, wie das System auf andere Inhibitoren der Apoptose reagieren wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurde das apoptoseinhibierende Peptid ZVAD eingesetzt. ZVAD ist ein kurzes Peptid, dessen Sequenz und Struktur in Abbildung 4.4 dargestellt ist. Es ist in der Lage, Caspase 1-ähnliche Proteasen zu inhibieren. Während also E1B-19kDa den mitochondrialen Weg der Apoptose durch Inhibition von bax lähmt, unterbindet ZVAD die Caspasen-Route der Apoptose.



Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F

Abbildung 4.4: Struktur und Sequenz des Apoptoseinhibitors Z-VAD-FMK

4.1.2.1 Das Peptides Z-VAD vermag auch in Gegenwart von überexprimiertem p53 die Degradierung des Proteins Parp zu verhindern

Um den Grad der induzierten Apoptose, bzw. der Inhibition der Apoptose feststellen zu können, wurde der Degradierungsstatus des Proteins Parp per Western Blot analysiert.

Der Apoptoseinhibitor ZVAD wurde in einem sehr ähnlichen experimentellen Ansatz eingesetzt wie unter 4.1.1.3 beschrieben: H1299 Zellen wurden mit Ad-p53wt und Ad-β-Gal transduziert und mit ZVAD behandelt. Da ZVAD in DMSO gelöst wurde, wurden die Vergleichszellen nur mit DMSO behandelt, um die experimentellen Bedingungen stabil zu halten.

Wie der Abbildung 4.5 entnommen werden kann, ist in den Zellen, die mit ZVAD behandelt wurden, keine Apoptose detektierbar, denn es ist kein gespaltenes Parp im Western Blot sichtbar.

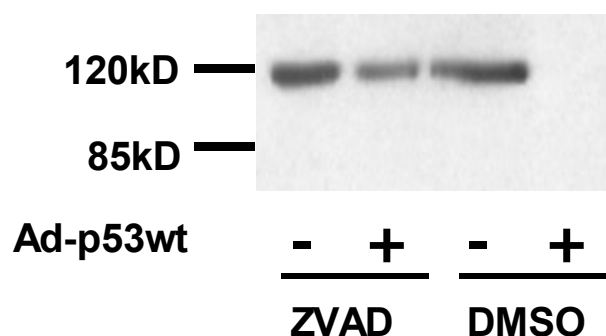


Abbildung 4.5: Menge und Degradierungsstatus des Proteins Parp. H1299 Zellen wurden mit Ad-p53wt und Ad-β-Gal transduziert, in der Abwesenheit oder Gegenwart von ZVAD. Da ZVAD in DMSO gelöst worden war, wurden die Kontrollen mit einer entsprechenden Menge DMSO behandelt, um die experimentellen Bedingungen stabil zu halten. 42h p.i. wurden die Zellen in RIPA geerntet. Es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulose-Membran und Nachweis mit Antikörpern gegen das Protein Parp. Ungespaltenes Parp hat eine Größe von 115kDa, während der Apoptose entsteht ein Fragment von 85kDa.

Wenn die Zellen nicht mit ZVAD behandelt worden waren und mit Ad-β-Gal transduziert wurden, war ebenfalls keine Parp-Spaltung erkennbar. Im Gegensatz dazu war Parp bei Zellen, die mit DMSO statt ZVAD behandelt und mit Ad-p53 transduziert worden waren, nicht mehr sichtbar. Dieser Tatbestand wurde häufig beobachtet, wenn die Zellen sich in einem relativ weit fortgeschrittenen Stadium der Apoptose befanden, und könnte auf weitergehende Proteolyse zurückzuführen sein.

Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass das Peptid ZVAD die Degradierung des Proteins Parp auch in Gegenwart von überexprimiertem p53 zu verhindern vermag.

4.1.2.2 Die Gene *Survivin* und *Stathmin* sind auch in Gegenwart des Apoptoseinhibitors Z-VAD durch p53 reprimierbar

Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit ZVAD sehr effektiv die p53 vermittelte Apoptose zu inhibieren vermag. Dadurch ist es nunmehr möglich, die Expressionslevel von *Survivin* und *Stathmin* losgelöst von der normalerweise durch p53 induzierten Apoptose zu analysieren, und somit die Frage zu beantworten, ob die Repression als Folge der Apoptose auftritt oder ein direkter Effekt von p53 ist. Die Zellen wurden dafür behandelt wie unter 4.1.2.1 beschrieben. Um die Expressionslevel von *Survivin* und *Stathmin* auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurde achtundvierzig Stunden nach der Infektion Gesamt-RNA isoliert und dann mit genspezifischen Primern revers transkribiert. Es folgte die Amplifikation eines Teilstückes der Gene, wobei die Hin-, bzw Rück-Primer auf verschiedenen Exons lagen.

In der Abbildung 4.6 kann man erkennen, dass die mRNA Level von *Survivin* und *Stathmin* in Gegenwart von Ad-p53 eine signifikante Repression aufweisen, während ein Kontrollgen (*Ubiquitin C*) eine stabile Expression zeigt. *PIG3*, ein p53-induzierbares Gen, ist jeweils stark hochreguliert, wenn p53 zur Expression gebracht wurde, was anzeigt, dass p53 transkriptionell aktiv ist.

Die Repression von *Survivin* und *Stathmin* ist unabhängig von der Gegenwart des Apoptoseinhibitors Z-VAD. Dies weist darauf hin, dass die Repression direkt von der Expression von p53 abhängt, aber völlig unabhängig vom Einsetzen der Apoptose ist.

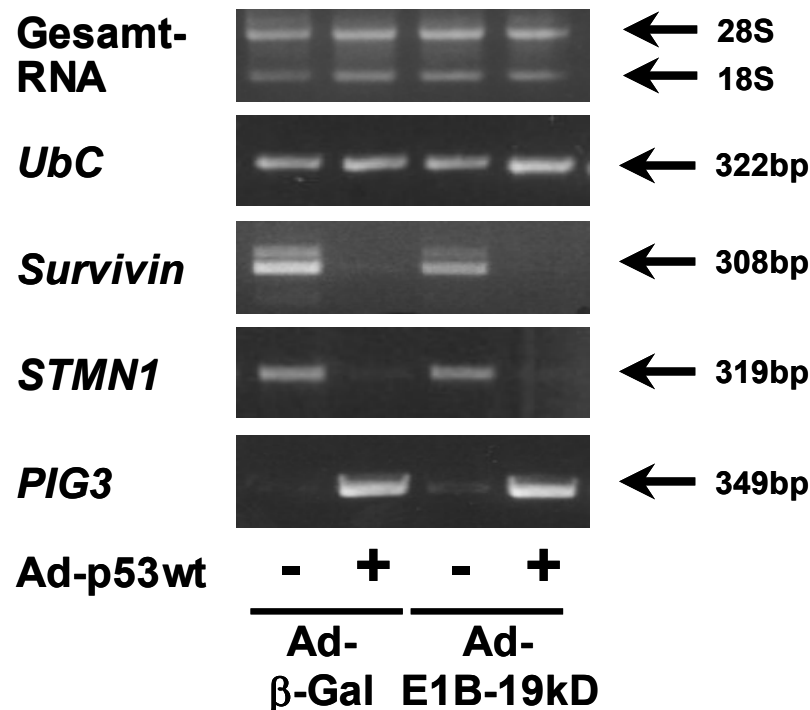


Abbildung 4.6: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Ubiquitin C (UbC)*, *Survivin*, *Stathmin (STMN1)* und *PIG3*. 2×10^5 H1299 Zellen je Ansatz wurden mit Ad-p53wt oder Ad-β-Gal transduziert und mit dem Apoptoseinhibitor ZVAD oder mit DMSO behandelt. 48h p.i. wurde Gesamt-RNA präpariert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

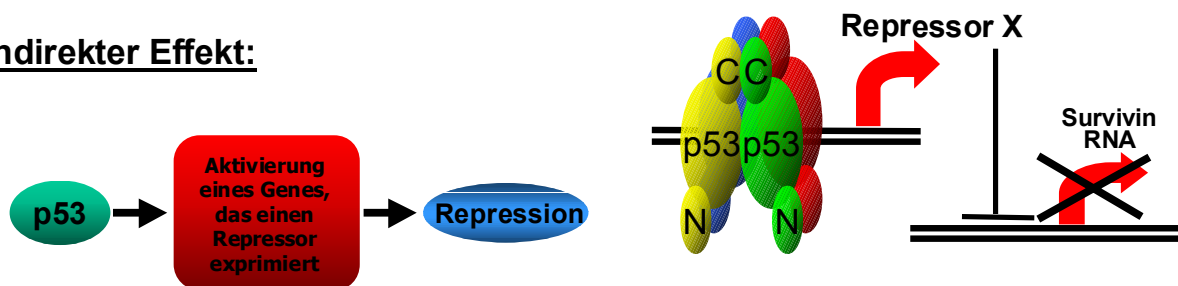
4.1.3 Die Repression der Gene *Survivin* und *Stathmin* durch p53 oder p73 wird auf indirektem Wege hervorgerufen

Beide Inhibitoren der Apoptose, sowohl ZVAD als auch E1B-19kDa, können Zellen daran hindern, in Apoptose zu gehen, haben aber keinen Einfluss auf die Repression von *Survivin* und *Stathmin* durch p53. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Repression dieser Gene kein Epiphänomen der Apoptose ist. Vielmehr muß es sich dabei um einen Effekt handeln, der durch die Gegenwart von p53 ausgelöst wird, denn p53 reprimiert diese Gene auch in Abwesenheit von Apoptose.

Die noch zu beantwortende Frage ist, ob dieser reprimierende Effekt, der von p53 ausgeht, direkter oder indirekter Natur ist. Wird die Repression also direkt durch p53 vermittelt, indem p53 z.B. an den Promoter von *Survivin* bindet, oder ist der Effekt indirekt, d.h. aktiviert p53 in seiner klassischen Funktion als Transaktivierungsfaktor

ein Gen, das dann seinerseits einen Repressor exprimiert? Diese beiden Möglichkeiten sind in Abbildung 4.7 dargestellt:

Indirekter Effekt:



Direkter Effekt:

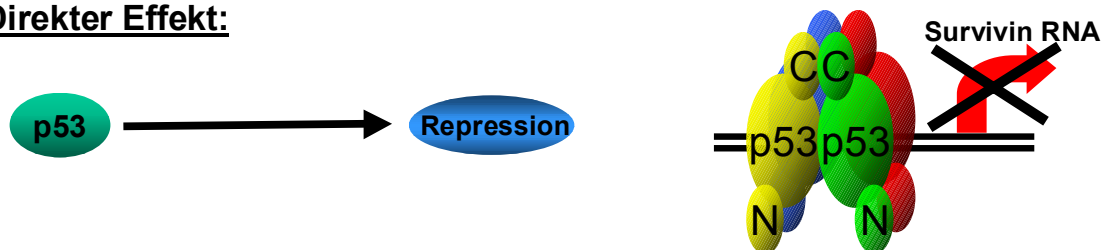


Abbildung 4.7: Zwei mögliche Modelle für die p53-vermittelte Repression

Als wichtiger Teilaspekt in der Beantwortung dieser Frage muß vor allem geklärt werden werden, ob die Transaktivierungsdomäne von p53 für die Repression notwendig oder entbehrlich ist.

4.1.3.1 Die Transaktivierungsdomäne von p73 ist nötig, um *Survivin* und *Stathmin* zu reprimieren

Um die Frage zu beantworten, ob p53 die Repression von *Survivin* oder *Stathmin* direkt oder indirekt induziert, wurden mehrere natürlich vorkommende Varianten und Splicing-Formen des p53-Homologen p73 verwendet.

Warum verwendet man p73 als Werkzeug, um genauere Einblicke in die p53-vermittelte Repression zu bekommen? Die Antwort liegt in den mannigfaltig vorkommenden Formen von p73: Es liegen in der Natur Varianten von p73 vor, denen die N-terminale transaktivierende Domäne fehlt, die aber dennoch fähig sind, an p53-responsive Promotoren zu binden. Diese sogenannten Delta N-Formen

können sehr gut benutzt werden, um die Bedeutung einer Transaktivierungsdomäne für p53-vermittelte Repression zu definieren.

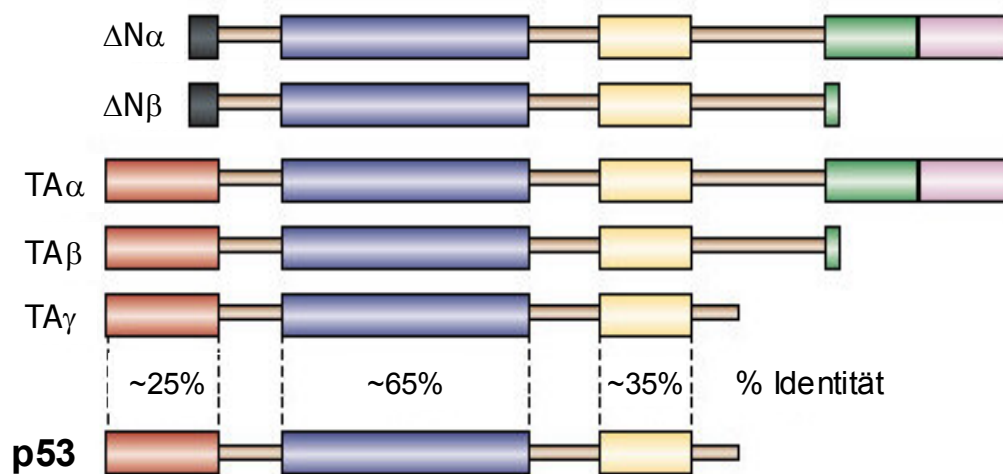


Abbildung 4.8: p53 und sein Homologes p73. Verschiedene in der Natur vorkommende Varianten und Splicing-Formen des p53-Homologen p73. Für die Bereiche *steric α -motif*, bzw. *post-SAM-domain* von p73 findet sich keine entsprechende, homologe Domäne bei p53 (nach Yeong und McKeon, 2002).

Für diesen Ansatz wurden H1299 Zellen mit rekombinanten, E1-deletierten Adenoviren infiziert, die wie weiter oben beschrieben hergestellt wurden (siehe 4.1.1.1). Mit Hilfe dieser Viren (Kartasheva et al., 2002) konnten folgende p73-Varianten zur Expression gebracht werden:

Ad-p73 $TA\beta$	Transkriptionell aktives p73
Ad-p73 $\Delta N\alpha$	Delta N Variante, die keine Transaktivierungsdomäne mehr enthält
Ad-p73 $\Delta N\beta$	Delta N Variante, die keine Transaktivierungsdomäne mehr enthält

Mit diesen Viren wurden H1299 Zellen (m.o.i.: 100) infiziert. Zweiundvierzig Stunden nach der Infektion wurde RNA geerntet und die Expressionslevel der relevanten Gene via RT-PCR untersucht.

Wie der Abbildung 4.9 entnommen werden kann, ist die transkriptionell aktive Form von p73 in der Lage, das p53-responsive Gen *PIG3* zu aktivieren, während die

transkriptionell inaktiven Delta-N Formen dazu nicht in der Lage sind. *Ubiquitin C*, das als Kontrollgen benutzt wurde, zeigt in allen Spuren die gleichen Expressionslevel und dient als Ladekontrolle.

Sowohl die Expressionslevel von *Survivin* als auch von *Stathmin* zeigen eine deutliche Repression in Gegenwart der transkriptionell aktiven Form von p73. Die Stärke der Repression entspricht bei *Survivin* der von p53 hervorgerufenen, bei *Stathmin* ist sie weniger stark ausgeprägt. Die transkriptionell inaktiven Delta N Formen von p73 hingegen sind nicht mehr in der Lage, eine Repression herbeizuführen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die transkriptionelle Aktivierung eine Vorbedingung für die Repression durch p53 ist, und diese Aktivierung kann nur erfolgen, wenn im Molekül eine Transaktivierungsdomäne vorhanden ist.

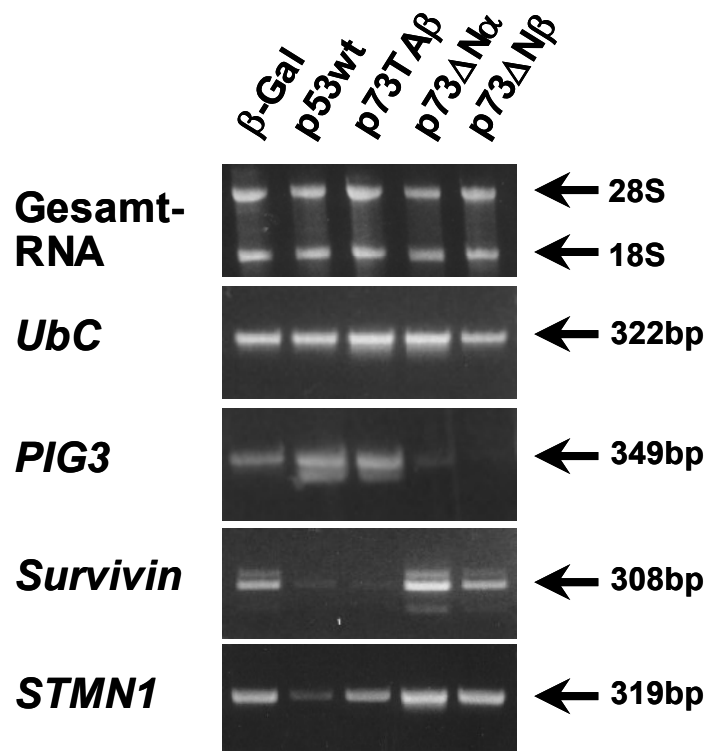


Abbildung 4.9: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Ubiquitin C* (*UbC*), *PIG3*, *Survivin* und *Stathmin* (*STMN1*). 2×10^5 H1299 Zellen je Ansatz wurden mit den angegebenen Viren (m.o.i.:100) transduziert. 42h p.i. wurde Gesamt-RNA präpariert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

Diese Daten legen nahe, dass p53, bzw. in diesem Versuch auch p73, nicht direkt durch Interaktion mit der Promoter-DNA die Repression vermittelt. Es ist vielmehr plausibel, dass durch die transkriptionell aktiven Formen von sowohl p53 als auch p73 Gene aktiviert werden, deren Produkte sich regulierend auf die Expressionslevel von *Survivin* und *Stathmin* auswirken.

4.1.4 Die Reprimierbarkeit des *Survivin*-Promoters wird nicht aufgehoben durch Deletion der putativen p53-Bindungsstelle

Zur Klärung der Frage, ob p53 direkt an den Promoter des *Survivin* Genes bindet und so seine Repression vermittelt, wurde eine Mutante des *Survivin* Promoters hergestellt, in der die vermeintliche p53-Bindestelle (Hoffman et al., 2002) in der zweiten Hälfte durch ortsgerichtete Mutagenese zerstört wurde. In der Abbildung 4.10 ist die Sequenz des wildtypischen Promoters wie auch der eingeführten Mutation gezeigt.

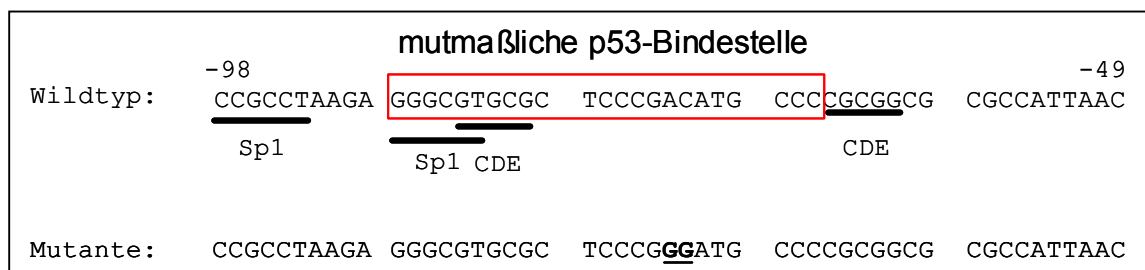


Abbildung 4.10: Sequenz des veröffentlichten p53-Bindestelle des *Survivin*-Promoters und durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführte Mutation

H1299 Zellen wurden mit dem Luziferase-Reporterkonstrukt transfiziert, welches das *luc*-Gen unter Kontrolle des veränderten *Survivin*-Promoters trägt. Zusätzlich wurde in die Zellen ansteigende Mengen p53-Expressionsplasmid (100-500ng) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion folgte das Ernten der Zellen und die Messung der Luziferaseaktivität mittels eines Luminometers. Zum Vergleich wurden H1299 Zellen mit einem Reporterplasmid, das den ursprünglichen *Survivin*-Promoter enthält, ebenfalls in Gegenwart ansteigender Mengen p53-Expressionsplasmid transfiziert.

Dieser Ansatz sollte Aufschluss darüber geben, ob die p53-binding site, die für den *Survivin*-Promoter beschrieben ist (Hoffman et al., 2002), wirklich ausschlaggebend für das Vermitteln der Repression durch p53 ist.

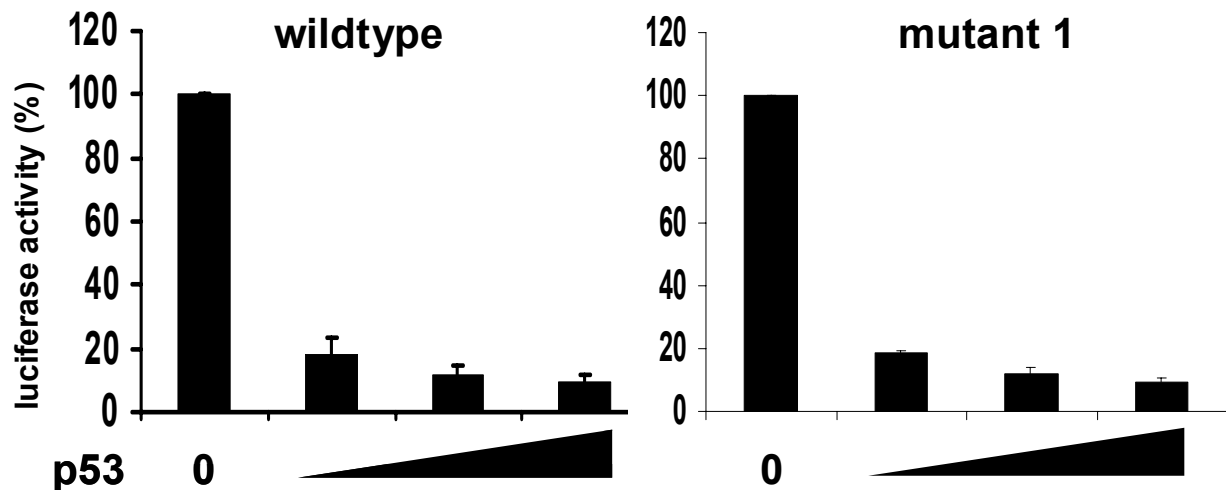


Abbildung 4.11: Aktivitäten zweier Luziferase-Reporterkonstrukte mit dem *Survivin*-Promoter mit wildtypischer und veränderter p53-Bindungsstelle nach Transfektion mit ansteigenden Mengen p53-Expressionsplasmid. 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden mittels FuGene mit den angegebenen Mengen p53-Expressionsplasmid sowie mit Reporterplasmiden, die entweder den wildtypischen *Survivin*-Promoter oder einen genetisch veränderten Promoter enthalten, transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und die Expressionshöhe der Luziferase anschließend durch Messung der Fluoreszenzintensität in einem Luminometer ermittelt. Die Werte sind relativ zur Aktivität des Reporters ohne p53-Expressionsplasmid dargestellt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (angegeben mit Standardfehler) (wildtype) wildtypischer *Survivin*-Promoter (angeblich p53-responsiv), (mutant1) *Survivin*-Promoter, dem durch ortsgerichtete Mutagenese die p53-binding site entfernt wurde.

Wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist, bleibt die Reprimierbarkeit des *Survivin*-Promoters also auch bei Beseitigung der p53-Bindestelle durch Mutagenese vollständig erhalten, was ein starker Hinweis darauf ist, dass die vermeintlich p53-responsive Sequenz gar nicht zur p53-Bindung benötigt wird, sondern ein anderer Mechanismus zur Repression von *Survivin* durch p53 führt.

4.1.4.1 Die Reprimierbarkeit der Gene *Survivin* und *Stathmin* ist abhängig von p21

Zur weiteren Untersuchung des Mechanismus, der der Repression von *Survivin* und *Stathmin* zugrunde liegt, wurden HCT116 Zellen verwendet. Diese Zellen wurden aus einem Colonkarzinom isoliert und bieten den großen Vorteil, dass sie in drei Genotypen zur Verfügung stehen:

HCT116 NEO:	trägt eine Neomycin-Resistenz, in Bezug auf p53 und p21 wildtypisch.
HCT116 p53 ^{-/-} :	das p53-Gen wurde "ausgeknockt", die Zellen tragen eine Neomycin- und Hygromycin-resistenz.
HCT116 p21 ^{-/-} :	das p21-Gen wurde "ausgeknockt", die Zellen tragen eine Neomycin- und Hygromycin-resistenz.

Diese drei Zelllinien wurden mit Doxorubicin Hydrochlorid (Adriamycin®) behandelt, einer Substanz, die in der Lage ist, DNA-Doppelstrangbrüche auszulösen. Doxorubicin wurde mit dem Medium gemischt und verblieb für achtundvierzig Stunden auf den Zellen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert. Parallel wurde zum Vergleich eine mock-Kontrolle mit unbehandelten Zellen durchgeführt.

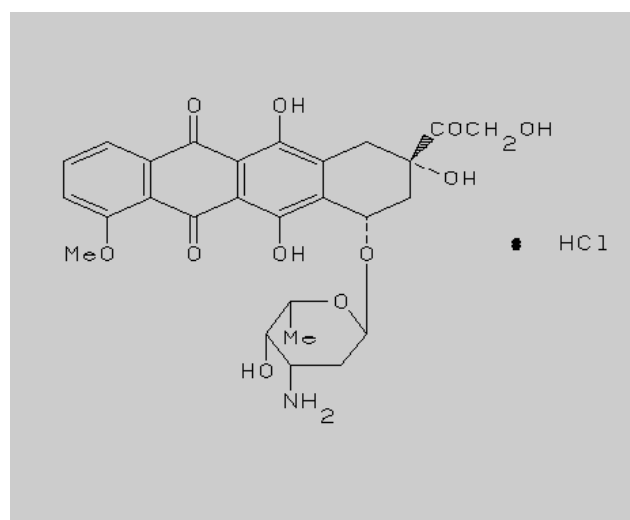


Abbildung 4.12: Strukturformel von Doxorubicin.

In Abbildung 4.13 kann man erkennen, dass durch die Behandlung der Zellen mit Doxorubicin das endogen vorhandene p53 aktiviert wird: die mRNA-Level des Genes *PIG3*, das direkt durch p53 induziert wird, sind bei den HCT Zellen, die p53 enthalten (Spuren 2 und 4) deutlich erhöht, während die Level eines unbeteiligten Kontrollgenes (*Ubiquitin C*) gleich bleiben. Fehlt das *p53*-Gen, wie in den letzten beiden Spuren der Fall, da die HCT Zellen mit "ausgeknocktem" *p53* benutzt wurden, so ist auch keine Aktivierung von *PIG3* zu sehen.

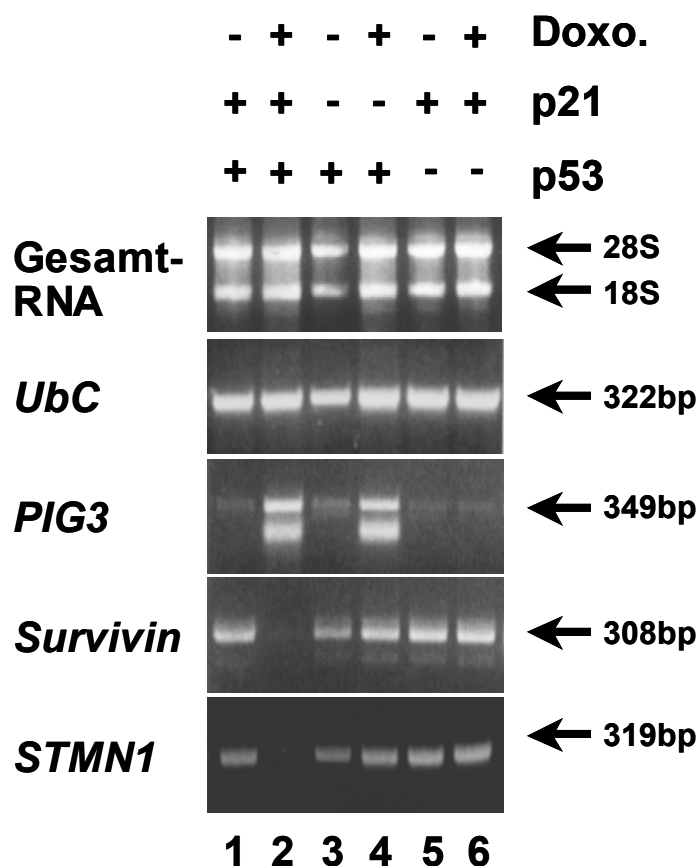


Abbildung 4.13: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Ubiquitin C (UbC)*, *PIG3*, *Survivin* und *Stathmin (STMN1)*. 3×10^5 Zellen je Ansatz wurden für 48h mit Doxorubicin behandelt, danach wurde Gesamt-RNA isoliert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an. Es wurden HCT116 Zellen verwendet, in denen entweder p53 oder p21 "ausgeknockt" worden war, als Vergleich wurde die Ursprungszelllinie HCT116 NEO benutzt, die eine Neomycin-Resistenz trägt, ansonsten aber genetisch nicht verändert wurde, also sowohl p53 als auch p21 exprimiert.

Survivin und *Stathmin* wiederum zeigen eine Repression, die dann auftritt, wenn p53 durch Zugabe von Doxorubicin aktiviert wird. Interessanterweise läßt sich diese Repression von *Survivin* und *Stathmin* nicht beobachten, wenn den Zellen *p21* fehlt (Spuren 3 und 4), obwohl die uneingeschränkte Aktivität von p53 anhand der *PIG3*-Expression nachweisbar ist (Spur 4). Damit werfen diese Ergebnisse insofern ein

neues Licht auf die p53-vermittelte Repression, als dass dazu nicht nur p53, sondern auch p21 notwendig ist.

4.1.4.2 Die p53-vermittelte Repression ist in allen untersuchten Genen von p21 abhängig

Zusätzlich zu den unter 4.1.4.1 genannten Genen wurden weitere bisher in der Literatur als p53 reprimierbar beschriebene Gene getestet.

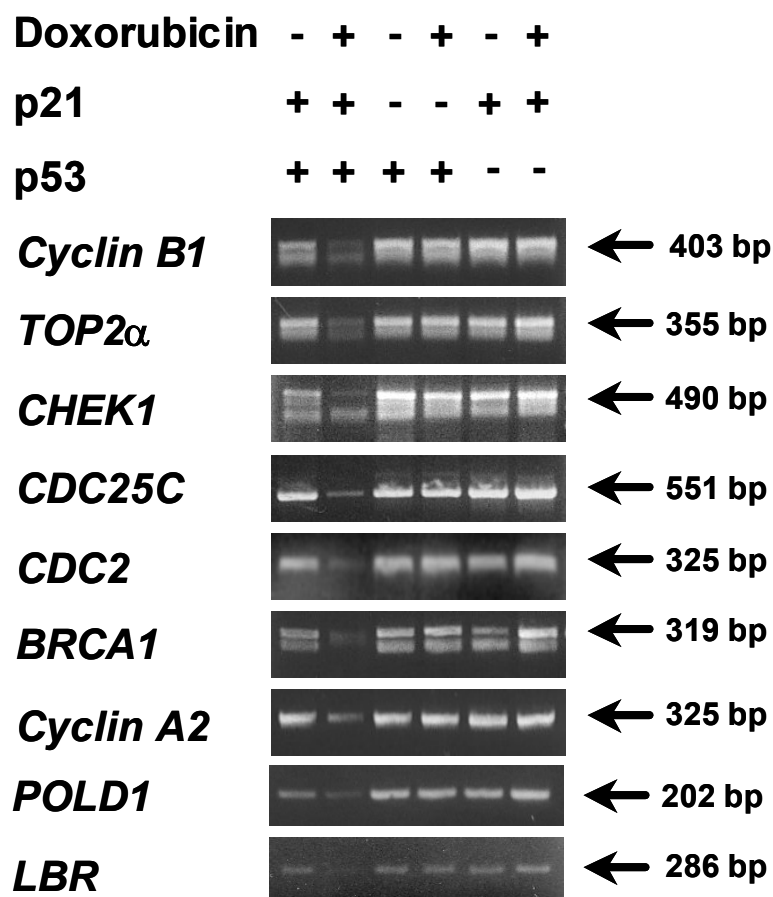


Abbildung 4.14: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Cyclin B1*, *Topoisomerase 2α* (*TOP2α*), *CHEK1*, *CDC25C*, *CDC2*, *BRCA1*, *Cyclin A2*, *POLD1* und *Lamin B Rezeptor (LBR)*. 3×10^5 Zellen je Ansatz wurden für 48h mit Doxorubicin behandelt, danach wurde Gesamt-RNA isoliert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an. Es wurden HCT116 Zellen verwendet, in denen entweder p53 oder p21 "ausgeknockt" worden war, als Vergleich wurde die Ursprungszelllinie HCT116 NEO benutzt, die eine Neomycin-Resistenz trägt, ansonsten aber genetisch nicht verändert wurde, also sowohl p53 als auch p21 exprimiert.

In allen untersuchten Fällen, ist die Anwesenheit von p21 zur Repression notwendig. Die Abhängigkeit der p53-vermittelten Repression von p21 scheint also ein allgemein gültiges Phänomen zu sein.

4.1.4.3 p21 ist nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die p53-vermittelte Repression

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, dass p21 notwendig zur p53-vermittelten Repression ist, stellt sich nun die Frage, ob es auch hinreichend sein kann. Um dieser Frage nachzugehen, wurden H1299 Zellen mit Adenoviren transduziert, die entweder β -Galactosidase, p53 oder p21 überexprimieren. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion wurde die Gesamt-RNA geerntet und mittels RT-PCR analysiert.

Aus Abbildung 4.15 geht hervor, dass sich die meisten der getesteten Gene auch von p21 in Abwesenheit von endogenem p53 in ähnlichem Maße wie von p53 selbst reprimieren lassen. Daraus folgt der Schluss, dass p21 nicht nur notwendig zur Vermittlung der Repression ist, sondern sie auch selbst hervorrufen kann, somit also hinreichend ist.

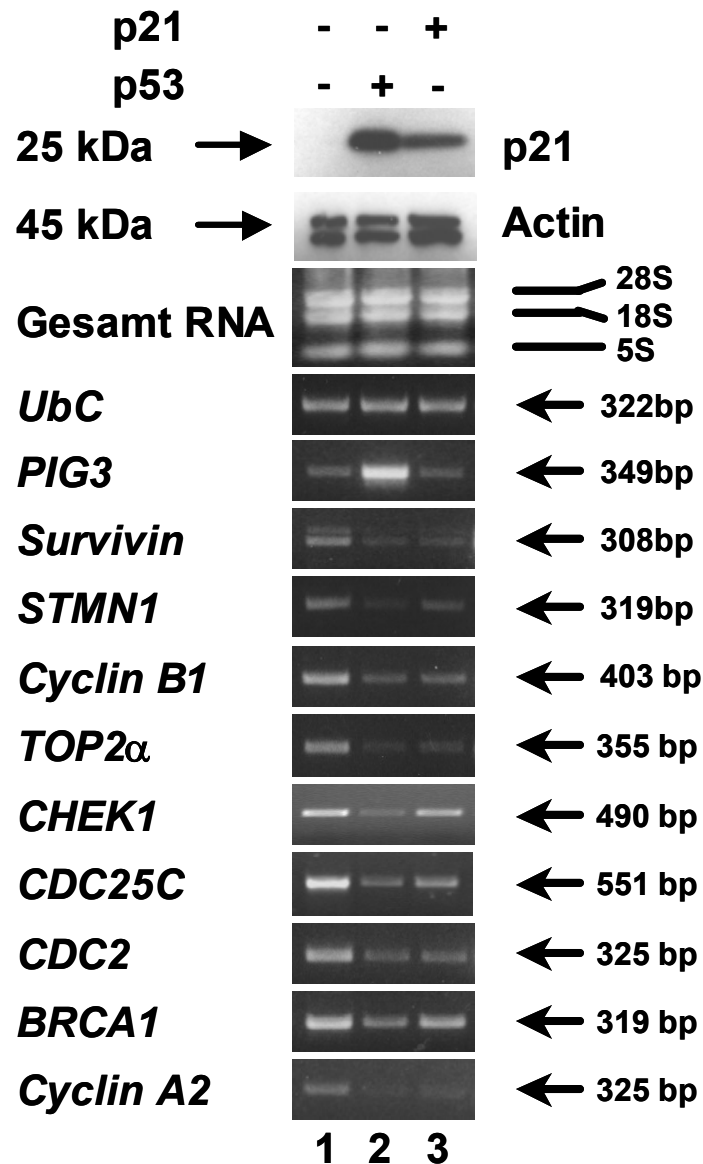


Abbildung 4.15: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Ubiquitin C (UbC)*, *PIG3*, *Survivin*, *Stathmin (STMN1)*, *Cyclin B1*, *Topoisomerase 2α (TOP2α)*, *CHEK1*, *CDC25C*, *CDC2*, *BRCA1* und *Cyclin A2*. 3×10^5 H1299 Zellen je Ansatz wurden mit den angegebenen Virus-Kombinationen transduziert. 48h nach Infektion wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

4.1.4.4 Die p53-vermittelte Repression ist aufhebbar durch gleichzeitige Expression von Myc

Es wurde unlängst publiziert (Seoane et al., 2002; Vousden, 2002), dass das zelluläre Protein Myc die transkriptionelle Aktivierung von p21 durch p53 zu

inhibieren vermag. Da p21 zur Vermittlung der Repression notwendig ist, müßte es möglich sein, die Repression durch gleichzeitige Expression von Myc aufzuheben.

Um diese Hypothese zu testen, wurden H1299 Zellen mit einem p53 oder einem β -Galactosidase exprimierenden Adenovirus transduziert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit einem Myc exprimierendem Virus überinfiziert.

Aus Abbildung 4.16 geht hervor, dass die Überexpression von Myc in der Tat zu einer verminderten Menge an p21 mRNA führt. Ebenfalls ist die Myc-Expression in der Lage, die durch p53 hervorgerufene Repression von *Survivin* und *Stathmin* aufzuheben. Myc ist also tatsächlich fähig, als Antagonist der p53-vermittelten Repression zu wirken.

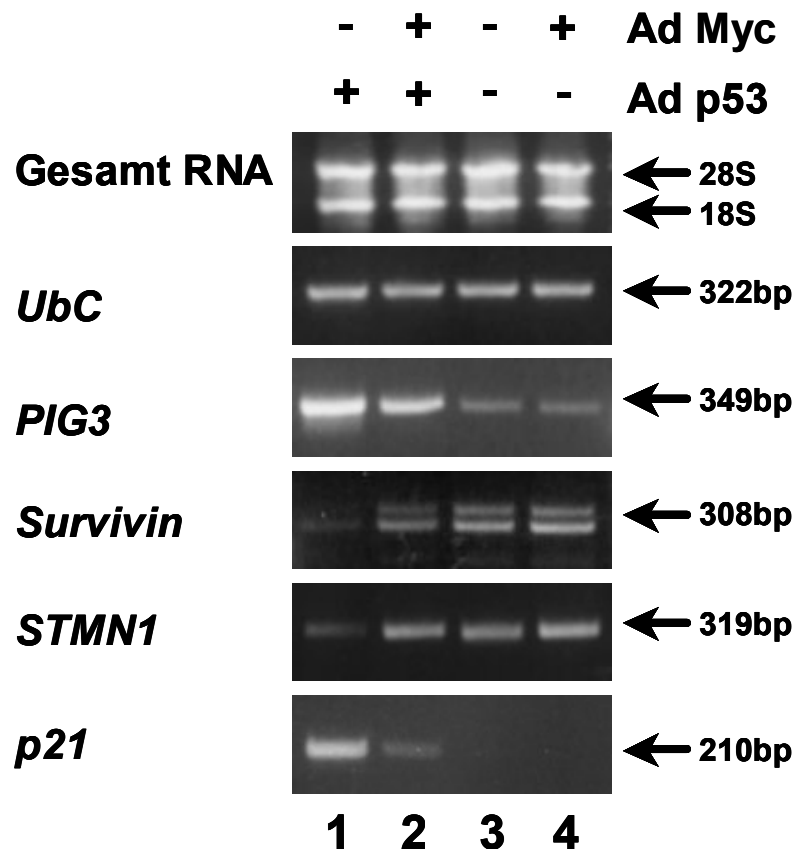


Abbildung 4.16: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Ubiquitin C (UbC)*, *PIG3*, *Survivin*, *Stathmin (STMN1)* und *p21*. 3×10^5 H1299 Zellen je Ansatz wurden mit den angegebenen Virus-Kombinationen transduziert. 48h nach Infektion wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

4.1.4.5 Das große T-Antigen des *simian vacuolating virus* 40 (SV40) ist in der Lage, die p53-vermittelte Repression aufzuheben

Es konnte gezeigt werden, dass die p53-vermittelte Repression durch Zugabe von einem Proto-Onkogen wie Myc aufgehoben werden kann. Es stellte sich also die Frage, ob es sich dabei um ein auf Myc beschränktes Phänomen handelt oder ob es auch durch Zugabe anderer die Zellproliferation stimulierenden Agenzien, wie z.B. dem großen T-Antigen des *simian vacuolating virus* 40 (SV40), herbeigeführt werden kann.

Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden H1299 Zellen mit einem Adenovirus, das β -Gal (Ad- β -Gal) oder p53 (Ad-p53) überexprimiert, jeweils in Gegenwart oder Abwesenheit eines T-Antigen-exprimierenden Virus (Ad-SV 40 T-Ag₁₋₂₆₀) transduziert. Exprimiert wurde ein aminoterminales Fragment vom T-antigen, das nicht an p53 bindet, aber die Zellproliferation stimuliert (Dobbelstein et al., 1992). Um die Expressionslevel von *Ubiquitin*, *Survivin* und *Stathmin* auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurde achtundvierzig Stunden nach der Infektion Gesamt-RNA isoliert und mit genspezifischen Primern revers transkribiert. Es folgte die Amplifikation eines Teilstückes der Gene.

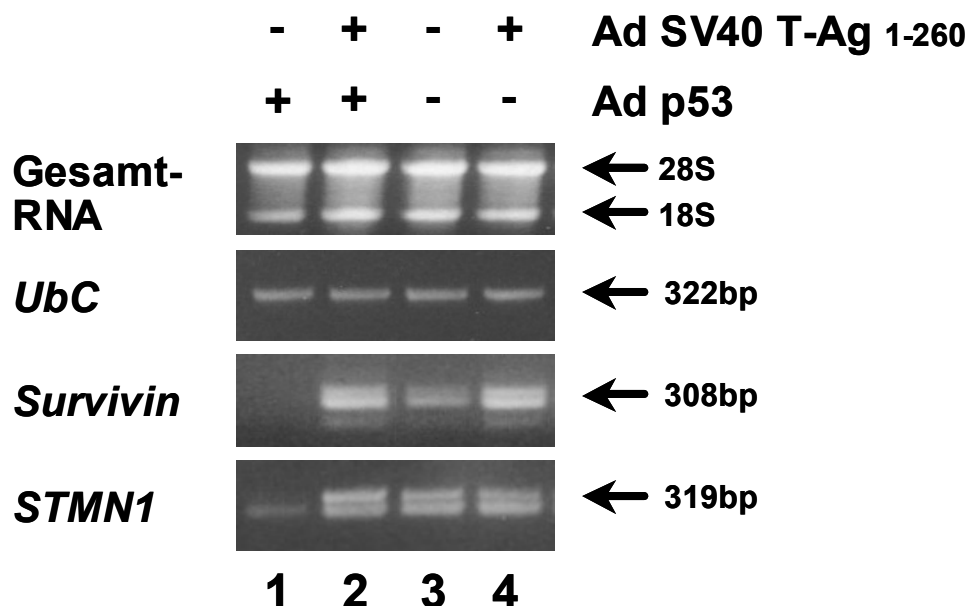


Abbildung 4.17: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *Ubiquitin C (UbC)*, *Survivin* und *Stathmin (STMN1)*. 3×10^5 H1299 Zellen je Ansatz wurden mit den angegebenen Virus-Kombinationen transduziert. 48h nach Infektion wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

Aus Abbildung 4.17 geht hervor, dass die durch p53 hervorgerufene Repression von *Survivin* und *Stathmin* in Gegenwart von SV40 T-Ag vollständig aufgehoben wird, während ein Kontrollgen (*Ubiquitin C*), nicht dadurch beeinflusst wird. Dies spricht dafür, dass neben Myc auch andere proliferationsstimulierende Agenzien zur Aufhebung dieser Repression befähigt sind.

4.2 Beeinflussung der zellulären Transkription durch Infektion mit wildtypischem Adenovirus (dl309)

4.2.1 Unter 4600 untersuchten Genen werden nur 14 mit mehr als dreifach differentieller Regulation detektiert

Das Ergebnis der Array-Hybridisierungen ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Von 4.600 gespotteten Genen waren 1200 reproduzierbar und oberhalb des Hintergrundes detektierbar. Überraschenderweise wurde nur eine relativ kleine Gruppe von Genen durch die Adenovirusinfektion differentiell reguliert gefunden. Nur 75 Gene waren mehr als zweifach und 14 mehr als dreifach differentiell reguliert.

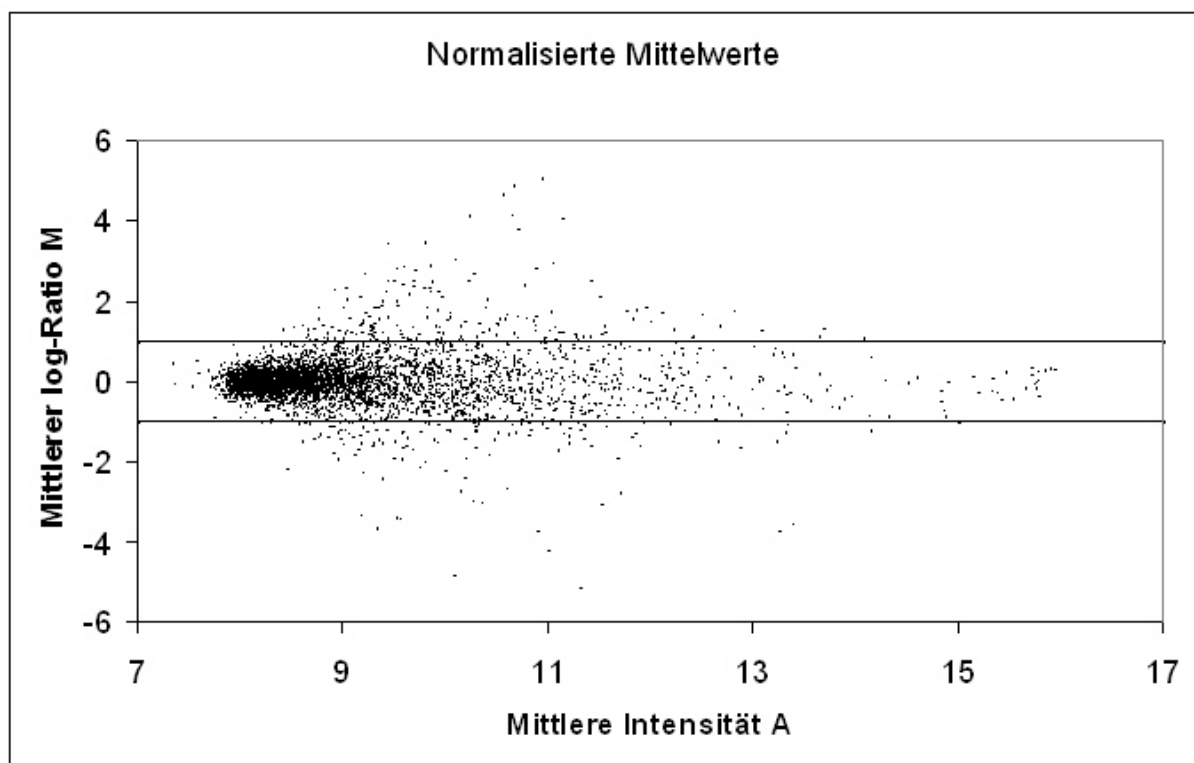


Abbildung 4.18: Expressionslevel von 4600 analysierten Genen im Vergleich von Mock vs. Adenovirus (dl309) infizierten Zellen. Mikroarrays wurden mit cDNA-Pools hybridisiert, die von Adenovirus-, bzw. mock-infizierten Zellen isoliert worden waren. Die Spotintensitäten wurden bestimmt und die mittlere Intensität aus acht Spots je Gen berechnet. Für jedes Gen ist das \log_2 Verhältnis der Signalintensitäten aufgetragen gegen die durchschnittliche Signalintensität.

In ähnlichen Experimenten, in denen der einzige Unterschied zwischen den untersuchten Zellpopulationen die Expression von Transkriptionsfaktoren wie p73 oder p53 war, betrug die Anzahl der differentiell exprimierten Gene etwa ein

Dreifaches (A. Contente, N. N. Kartasheva, M. Dobbstein, Unveröffentlichte Daten). Obwohl diese Experimente nicht direkt vergleichbar sein mögen, kann man aus dieser Gegenüberstellung doch den Schluss ziehen, dass die Adenovirusinfektion die Expression eines Großteils der untersuchten Gene nur wenig (kleiner als zweifach differentiell reguliert) zu beeinflussen vermag und nur eine sehr kleine Gruppe von Genen ihr Expressionsmuster stark ändert.

Die Gene, auf die die Adenovirusinfektion den größten Einfluss hatte und die einen d-Wert (score) von über eins aufweisen, sind in der Tabelle 4.1. dargestellt.

Formel für den Score (pro Gen):

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s + s_0}, \quad s = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}, \quad s_0 > 0$$

s_0 ist eine positive Konstante, die aus den Daten geschätzt wird (dient der besseren Vergleichbarkeit zwischen den Genen; Bis auf s_0 entspricht sie der t-Statistik.)

Gen	vollständiger Gen Name	d-Wert	MW M	x-fache Aktivierung ($2^{MW M}$)
SPUVE	serine protease, umbilical endothelium	1,812	2,276	4,8
LOXL1	lysyl oxidase-like 1	-1,385	-1,939	-3,8
CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	1,303	2,007	4,0
MYC	Myc	1,216	1,887	3,7
NPTX1	neuronal pentraxin I	1,194	1,866	3,6
TOB1	transducer of ERBB2, 1	1,141	1,536	2,9
HSOBRGRP	Homo sapiens mRNA for leptin receptor gene-related protein	1,085	1,432	2,7
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	1,023	1,465	2,7

Tabelle 4.1: Zelluläre Gene, die während der späten Phase der Adenovirusinfektion im Vergleich zu uninfizierten Zellen differentiell reguliert werden. Es wurden zwei verschiedene EST-Klone, die beide für MYC kodieren, geprintet.

Die meisten dieser Gene werden während der Adenovirusinfektion herunterreguliert, wie z.B. *Myc (MYC)* und *TOB1* alias (*APRO6*), lediglich *LOXL1* wird stärker exprimiert, als in den uninfizierten Vergleichszellen.

4.2.2 Die differentielle Expression der im Array identifizierten Gene konnte via RT-PCR verifiziert werden

Um die im Array gefundenen veränderten Expressionspattern der Gene zu verifizieren, wurden die RNA-Level der betroffenen Gene durch reverse Transkription, gefolgt von semi-quantitativer PCR, bestimmt. Dort, wo es nicht möglich war, die Hin- und Rück-Primer auf verschiedenen Exons der jeweiligen Gene zu plazieren, wie z.B. bei *TOB1*, *CD24*, Serin-Protease (*SPUVE*), und Pentraxin (*NPTX1*), wurde vor der reversen Transkription ein DNase I-Verdau durchgeführt, um sicherzustellen, dass eventuell vorhandene genomische DNA entfernt wird. Für die reverse Transkription sowie für die anschließende PCR wurden genspezifische Primer verwendet, deren Sequenzen im Material- und Methodenteil aufgelistet sind.

Die mittels Mikroarray gefundene differentielle Expression der Gene konnte in HeLa-Zellen in allen Fällen bestätigt werden. Um herauszufinden, ob eine Adenovirusinfektion auch in einer anderen Zelllinie dieselben Gene in ihrer Expression modulieren kann, wurden H1299-Zellen (humane Lungenadenokarzinomzellen) ebenfalls infiziert. Auch hier wurde die Gesamt-RNA geerntet, gefolgt von einer RT-PCR-Analyse.

In H1299 Zellen konnte die verstärkte Expresssion von *LOXL1* nicht beobachtet werden, ebensowenig die Repression von *NPTX1*. In allen anderen Fällen jedoch zeigten sich die gleichen Ergebnisse wie vorher in HeLa Zellen. Dies zeigt, dass das transkriptionelle Regulationsmuster, das durch die Adenovirusinfektion hervorgerufen wird, nicht nur auf eine Zelllinie beschränkt ist.

Gen	HeLa m v m v		H1299 m v m v		Array- analyse	Reproduzierbarkeit via RT-PCR in HeLa H1299	
<i>SPUVE</i>					← 456 bp 4.8×↓	+	+
	30	35	25	30			
<i>LOXL1</i>					← 415 bp 3.8×↑	+	-
	25	30	25	30			
<i>CD24</i>					← 546 bp 4.0×↓	+	+
	30	35	30	35			
<i>MYC</i>					← 408 bp 3.7×↓	+	+
	25	30	25	30			
<i>NPTX1</i>					← 364 bp 3.6×↓	+	-
	30	35	30	35			
<i>TOB1</i>					← 459 bp 3.9×↓	+	+
	25	30	25	30			
<i>HSOBRGRP</i>					← 400 bp 2.7×↓	+	+
	25	30	25	30			
<i>HPRT1</i> – Kontrolle					← 443 bp nicht geprintet		
	25	30	25	30			

m – mock infiziert; v – dl309 infiziert

Abbildung 4.19: RT-PCR Analyse der mRNA-Level der Gene, die in der Array-Analyse differentiell exprimiert gefunden wurden. HeLa Zellen wurden mit Adenovirus dl309 (m.o.i.: 10) oder mock-infiziert. Nach 24h wurde Gesamt-RNA geerntet. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

4.2.3 Die Repression von *Myc* und *TOB1* ist abhängig von der Anwesenheit sich replizierender Viren

Es blieb die Frage zu beantworten, ob die Replikation der adenoviralen DNA und der daraus erfolgende *early-to-late switch* nötig sind für die Repression von *Myc* und *TOB1*. Um dies zu beantworten, wurden HeLa Zellen mit dl309 infiziert, bzw. uninfiziert belassen. In beiden Fällen wurde drei Stunden nach der Infektion der Zellen ein Inhibitor der Replikation, AraC (Cytosin Arabinose), ins Medium gegeben. Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und RNA isoliert, und die Expressionslevel von *Myc* und *TOB1* wurden via RT-PCR untersucht. Während die Anwesenheit von AraC die Genexpression in den mock-infizierten

Zellen nicht nachweisbar beeinflusste, hob sie die Repression von *Myc* und *TOB1* in den dl309-infizierten Zellen komplett auf.

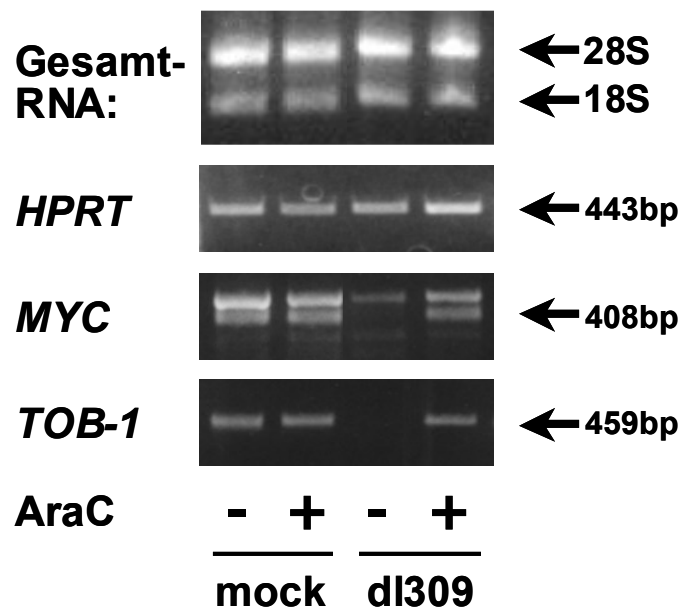


Abbildung 4.20: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *HPRT*, *MYC* und *TOB1*. 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden mit dl309 oder mock-infiziert (m.o.i.: 10). 3h p.i. wurde AraC zu den Zellen gegeben und 24h p.i. wurde Gesamt-RNA isoliert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

Die Western Blot Analyse (Abbildung 4.21) zeigte, dass die Expression des E1A Proteins nicht durch die Anwesenheit von AraC beeinflusst wird. Daraus kann geschlossen werden, dass die frühen adenoviralen Genprodukte, inklusive E1A, für die Vermittlung der Repression nicht ausreichend sind.

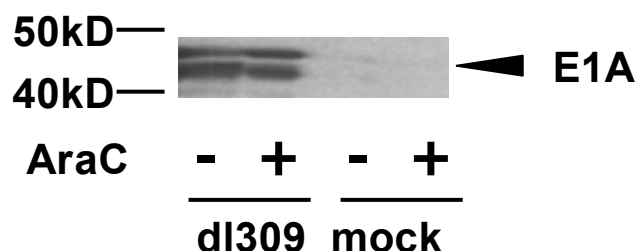


Abbildung 4.21: Auswirkung der AraC-Behandlung dl309- oder mock-infizierter Zellen auf den Expressionslevel des Proteins E1A. Je Ansatz wurden 2×10^5 HeLa Zellen mit dl309 oder mock-infiziert (m.o.i.: 10). 3h p.i. wurde AraC zu den Zellen gegeben und 24h p.i. wurden die Zellen in RIPA geerntet. Es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulose-Membran und Nachweis mit Antikörpern gegen das Protein E1A.

4.2.4 Zur Repression von *Myc* und *TOB1* sind die Proteine E1B-55kDa, E4orf3 und E4orf6 nicht nötig, E1B-55kDa und E4orf6 verstärken jedoch die Repression

Um zu testen, ob die Änderung des Expressionmusters der Gene *Myc* und *TOB1* von einem bestimmten adenoviralen Protein abhängt, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Mutanten des Adenovirus Typ 5 (m.o.i.: 10) infiziert, denen jeweils verschiedene Proteine fehlten:

dl309	Deletion von VAII und einem Teil der E3-Region	
dl338	Deletion von E1B-55kDa	zusätzlich zu den Veränderungen in dl309
dl355	Deletion von E4orf6	
E4inorf3	Deletion von E4orf3	

E1B-55kDa- und E4orf6-Deletionsmutanten wurden getestet, da sie nicht mehr in der Lage sind, die zelluläre Proteinsynthese zu inhibieren, und dies mag sich wiederum auf die zelluläre Transkription auswirken (Babiss et al., 1985; Halbert et al., 1985; Leppard und Everett, 1999; Pilder et al., 1986). Eine E4orf3-Deletionsmutante wurde getestet, weil bekannt ist, dass E4orf3 fähig ist, die Expression von Methallothionein zu beeinflussen, so dass es möglich wäre, dass es auch in die Regulation anderer Gene involviert ist.

HeLa Zellen wurden mit den verschiedenen Mutanten des Adenovirus Typ 5 infiziert, 24 h nach Infektion wurde Gesamt-RNA geerntet und die Expressionslevel von *Myc* und *TOB1* via RT-PCR bestimmt. Sämtliche Adenovirusmutanten waren in der Lage, *Myc* und *TOB1* zu reprimieren. Dies bedeutet, dass weder E1B-55kDa-, noch E4orf3 oder E4orf6 zur Repression benötigt werden. Die Mutanten, denen E1B-55kDa oder E4orf6 fehlten, waren immer noch in der Lage, die Expression von *TOB1* zu reprimieren, wenn auch in einem etwas geringeren Maße als dl309. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der *host cell shut down* die Repression von *Myc* und *TOB1* verstärken kann, aber nicht dazu notwendig ist.

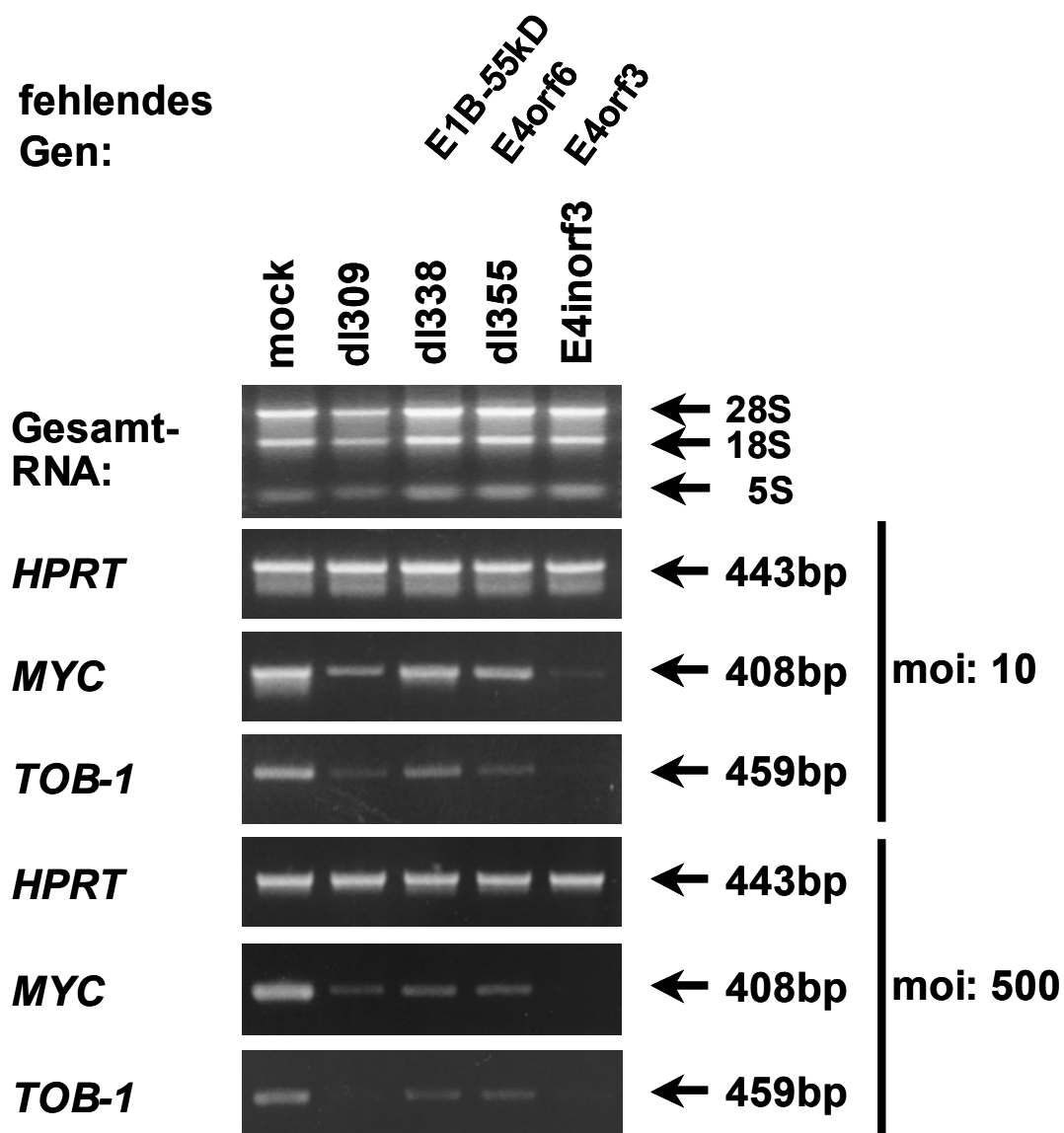


Abbildung 4.22: RT-PCR Analyse der mRNA Level der Gene *HPRT*, *MYC* und *TOB1*. 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden mit den angegebenen Viren infiziert, bzw. transduziert (m.o.i.: 10, bzw. 500). 24h p.i. wurde Gesamt-RNA präpariert. Die mRNA wurde jeweils mit einem Gen-spezifischen Primer revers transkribiert. Es schloss sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

4.2.5 Das Myc-Protein wird durch die Infektion mit dl309 stabilisiert

HeLa-Zellen wurden mit dl309, bzw Ad- β -Gal (m.o.i. jeweils: 20) infiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion wurde Cycloheximid, eine Inhibitor der Translation, ins Medium gegeben. Die Zellen wurden damit weiter inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten in RIPA geerntet.

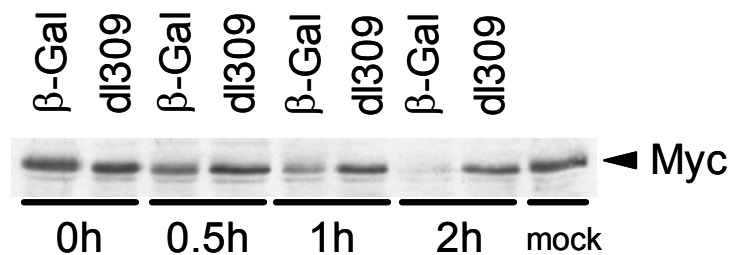


Abbildung 4.23: Analyse des Expressionslevels des Proteins Myc im Western Blot. Je Ansatz wurden 2×10^5 HeLa Zellen mit dl309 oder Ad- β -Gal (m.o.i.: 20) infiziert. 24h p.i. wurde Cycloheximid zu den Zellen gegeben und für die angegebene Zeit auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden in RIPA geerntet, es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulose-Membran und Nachweis mit Antikörpern gegen das Protein Myc.

In Abbildung 4.23 lässt sich deutlich erkennen, dass die Proteinlevel von Myc in Gegenwart von dl309 über die gesamte Inkubationsdauer stabil bleiben, während der Level von Myc in den Zellen, die mit Ad- β -Gal infiziert wurden, drastisch sinkt und nach zwei Stunden fast völlig verschwunden ist. Myc wird also in Gegenwart eines replikationskompetenten Adenovirus auf Proteinebene stabilisiert.

4.2.6 Zur Stabilisierung von Myc sind die Proteine E1B-55kDa, E4orf3 und E4orf6 nicht nötig

Es ist denkbar, dass ein bestimmtes Protein des Adenovirus die oben beschriebene Stabilisierung von Myc herbei führen kann. Aus diesem Grund wurden HeLa Zellen mit verschiedenen Virusmutanten, denen jeweils ein Gen fehlt, infiziert und vier Stunden vor der Ernte mit Cycloheximid behandelt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und per Immunoblot wurden die endogenen Myc-Mengen analysiert.

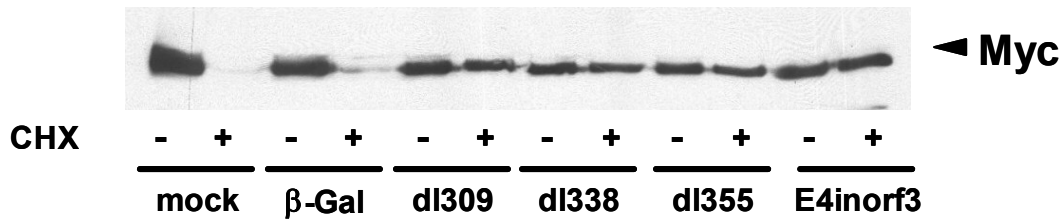


Abbildung 4.24: Expression der Proteinlevel von endogenem Myc in HeLa-Zellen, die mit verschiedenen Adenoviren infiziert wurden (jeweils m.o.i.:20). HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert und 24h p.i. in RIPA geerntet. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Dann erfolgte der immunochemische Nachweis von Myc.

Während in mock- oder Ad-β-Gal-infizierten Zellen die Myc-Menge durch Zugabe von Cycloheximid sehr stark gesenkt werden konnte (siehe Abbildung 4.24), so gelang dies bei den Zellen, die mit verschiedenen Adenoviren infiziert worden waren, nicht. Gleichgültig, welches Gen den verwendeten Viren fehlte – alle sind gleichermaßen in der Lage, die Akkumulation von Myc auch in Gegenwart eines Inhibitors der Proteinsynthese herbeizuführen.

Dies Ergebnis zeigt, dass weder E1b-55kDa, noch E4orf3 oder E4orf6 zur Stabilisierung von Myc benötigt werden.

4.2.7 Transient exprimiertes E1A vermag Myc zu stabilisieren

Um die Frage beantworten zu können, ob auch transient exprimiertes E1A in der Lage ist, Myc zu stabilisieren, wurden HeLa-Zellen mit einem E1A-Expressionsplasmid oder einem leeren Vektor transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Mengen der Proteine Actin und Myc via Western Blot analysiert.

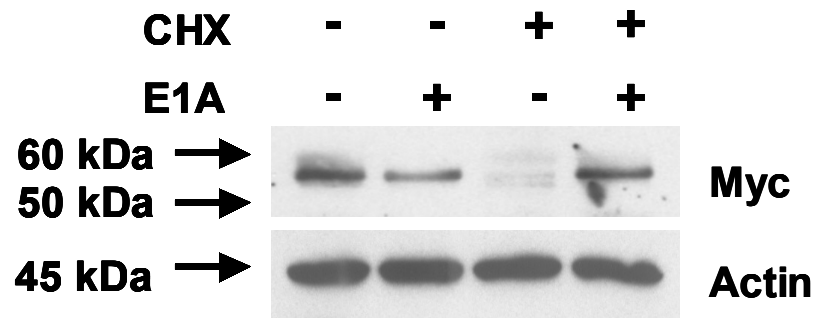


Abbildung 4.25: Expression der Proteinlevel von endogenem Myc in HeLa-Zellen, die mit verschiedenen Plasmiden transient transfiziert wurden. HeLa Zellen wurden mit leerem Vektor (pcDNA3) oder einem E1A-Expressionsplasmid transient transfiziert und 24h p.i. in RIPA geerntet. Vier Stunden vor der Ernte wurde Cycloheximid ins Medium gegeben. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Dann erfolgte der immunochemische Nachweis der Proteine Myc und Actin.

In Abbildung 4.25 ist erkennbar, dass die Zellen, die mit E1A oder leerem Vektorkonstrukt transfiziert worden waren, in Abwesenheit von Cycloheximid gleiche Mengen an Myc aufweisen. In Anwesenheit von Cycloheximid jedoch bleibt Myc nur in den Zellen nachweisbar, die mit einem E1A-Expressionsplasmid transfiziert worden waren.

Auch transient zur Expression gebrachtes E1A vermag also das endogene Myc zu stabilisieren.

4.2.8 Die Replikationsfähigkeit des Virus ist nicht notwendig für die Stabilisierung von Myc

Um zu erfahren, ob die Stabilisierung von Myc von der Replikation des Virus abhängt, wurden HeLa Zellen mit dl309 oder mock infiziert. Eine Hälfte der Zellen wurde gleichzeitig mit der Infektion mit AraC behandelt, einem Oligosaccharid, das sehr effektiv die Virusreplikation zu inhibieren vermag. Vier Stunden vor Ernte der Zellen wurde jeweils eine Hälfte eines Ansatzes mit Cycloheximid behandelt, um weitere Proteinsynthese auszuschließen. Insgesamt 24 Stunden nach Infektion wurden die Proteine aus den Zellen geerntet, über SDS-PAGE aufgetrennt und die Mengen an Myc, E1A und Actin mittels Immunoblot ermittelt.

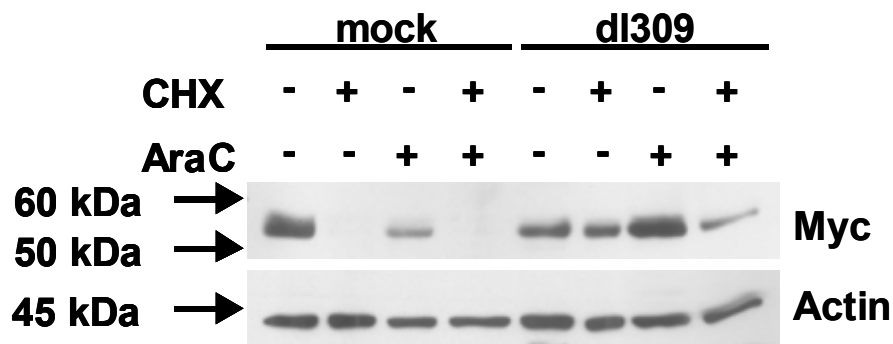


Abbildung 4.26: Expression der Proteinlevel von endogenem Myc in HeLa-Zellen, die mit dl309 (m.o.i.:20) oder mock infiziert wurden. HeLa Zellen wurden mit dl309 oder mock infiziert und 24h p.i. in RIPA geerntet. Gleichzeitig mit der Infektion wurde AraC ins Medium der Zellen gegeben. 4 Stunden vor der Ernte wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Dann erfolgte der immunochemische Nachweis von Myc.

In Abbildung 4.26 kann man erkennen, dass die Mengen an detektiertem Myc in mock infizierten Zellen durch Zugabe von Cycloheximid bis auf ein undetektierbares Niveau abfällt. Die An- oder Abwesenheit von AraC macht dabei keinen deutlichen Unterschied. In dl309 infizierten Zellen dagegen ist eine deutliche Stabilisierung von Myc zu beobachten. Unter Zugabe von AraC wird die Replikation des Virus sehr stark inhibiert. Dies ist deutlich an den E1A-Mengen zu erkennen: sind die Zellen mit dl309 infiziert, ist ein sehr starkes E1A-Signal zu beobachten, das merklich geschwächt werden kann durch Zugabe von Cycloheximid. Sind die Zellen aber mit AraC behandelt worden, so ist fast gar kein E1A-Signal mehr zu finden, dh die Virusreplikation wurde sehr effektiv inhibiert. Dennoch ist Myc im Vergleich zu mock-infizierten Zellen stabilisiert, d.h. die Virusreplikation ist nicht verantwortlich für die Akkumulation von Myc in infizierten Zellen.

4.2.9 Die Replikationsfähigkeit des Adenovirus dl309 wird durch gleichzeitige Überexpression von Myc vermindert

Es stellte sich die Frage, ob die transkriptionelle Repression von *Myc* im Verlauf der Adenovirusinfektion eine bloße Nebenerscheinung der Infektion ist, oder ob Myc den Replikationszyklus stören kann und vom Virus deswegen in seiner Expression

behindert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden Doppelinfektionsstudien mit dl309 und Ad-Myc, einem Expressionsvektor für Myc, durchgeführt.

HeLa Zellen wurden dafür mit dl309 infiziert und jeweils entweder mit einem β -Galaktosidase oder einem Myc überexprimierenden Vektor überinfiziert und nach vierundzwanzig, bzw. achtundvierzig Stunden geerntet. Aus den geernteten Zellen wurde Virus isoliert und anschließend auf H1299 Zellen titriert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.27 zu sehen.

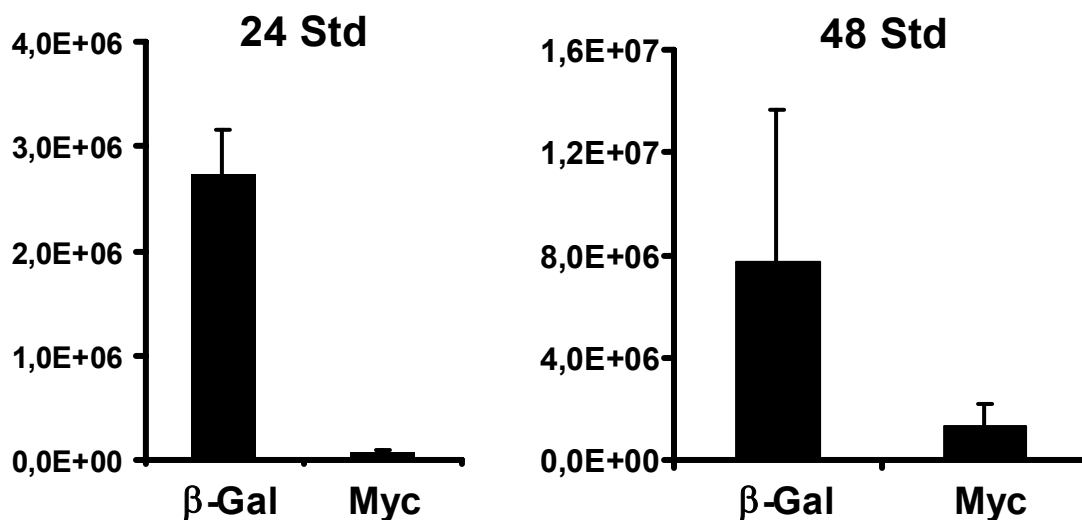


Abbildung 4.27: Replikation von dl309 in Anwesenheit verschiedener Mengen Ad- β -Gal, bzw. Ad-Myc. Je Ansatz wurden 2×10^5 HeLa Zellen mit dl309 (m.o.i.: 1) und Ad-Myc, bzw. Ad- β -Gal (m.o.i.: 20) infiziert, bzw. transduziert. 24h p.i. wurden die Zellen geerntet und in PBS^{def} durch mehrmaliges Frieren und Tauen lysiert. Mit dem so gewonnenen Virus wurden H1299 Zellen infiziert und 18h p.i. wurde der Titer durch Immunfärbung gegen das adenovirale Protein E2A bestimmt. Abbildung A: zeigt die 24h Werte, Abbildung B: 48h Werte.

Da in H1299 Zellen (durch Immunfärbung gegen das adenovirale E2A-Protein) titriert wird, kann nur der wildtypische Virus E1A und in der Folge auch E2A exprimieren. Ad-Myc ist ein E1-deletiertes Virus und ist zur Replikation daher auf komplementierende Zelllinien wie 911 oder 293 angewiesen.

In Abbildung 4.27 ist deutlich erkennbar, dass die Überexpression von Myc auf die Replikationsfähigkeiten von dl309 einen stark inhibierenden Effekt hat. Dieser Effekt ist nach 24 Stunden am stärksten ausgeprägt und wird mit fortschreitender Zeit immer schwächer. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Expression von Myc die Replikation von dl309 nachteilig beeinflussen kann und Myc aus diesem Grunde von dl309 herunterreguliert wird.

4.2.10 Die Überexpression von Myc hat keinen apoptoseinduzierenden Effekt in HeLa-Zellen

Eine mögliche Erklärung für die negative Beeinflussung der Adenovirusreplikation durch Expression von Myc liegt in den apoptoseinduzierenden Eigenschaften dieses Proteins: Es handelt sich bei Myc zwar um ein Proto-Onkogen, dieses ist jedoch ebenfalls in der Lage, den programmierten Zelltod auszulösen.

Um zu untersuchen, ob eine eventuell durch Myc ausgelöste Apoptose die zurückgehende Replikationsfähigkeit des Adenovirus herbeiführt, wurden HeLa-Zellen mit Ad- β -Gal oder Ad-Myc transduziert und 24, bzw. 48 h nach Infektion in RIPA geerntet.

Wie in Abbildung 4.28 zu sehen ist, zeigt sich nach 24 h in den Zellen, die mit Ad-Myc oder Ad- β -Gal transduziert wurden, kein gespaltenes Parp im Western Blot. Auch 48h nach der Transduktion ist bei den mit Ad-Myc behandelten Zellen nur in vernachlässigbar geringer Menge gespaltenes Parp zu detektieren. Die Menge des Spaltproduktes ist nicht vergleichbar mit der ebenfalls aufgetragenen Positivkontrolle der TNF α -induzierten Apoptose in HeLa-Zellen (letzte Spur).

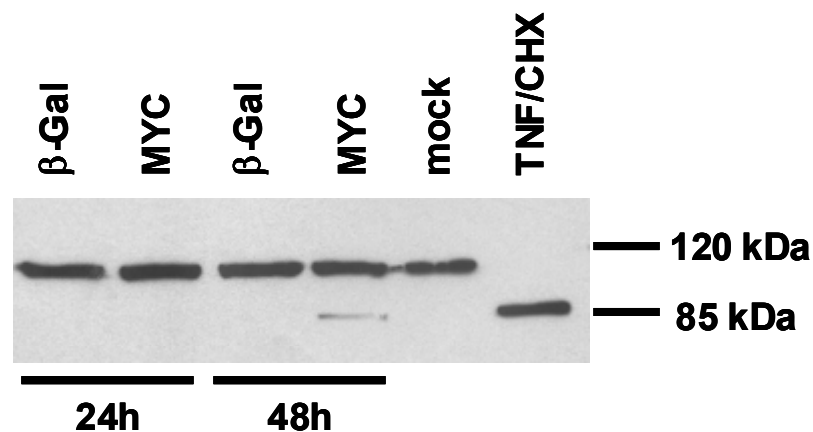


Abbildung 4.28: Expression von endogenem Parp (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden entweder mit Ad- β -Gal oder Ad-Myc transduziert und 24, bzw 48h p.i. in RIPA geerntet. Es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulose-Membran und Nachweis mit Antikörpern gegen das Protein Parp. Ungespaltenes Parp hat eine Größe von 115kDa, während der Apoptose entsteht ein Fragment von 85kDa.

Aus diesem Ergebnis kann der Schluss gezogen werden, dass die Überexpression von Myc in HeLa-Zellen erst sehr spät und in nur geringem Maße zur Apoptose führt und daher auf die Replikation des Adenovirus in diesen Zellen keinen Einfluss haben sollte.

4.2.11 Die Expression von E2A ist auf Protein- und mRNA-Level in Gegenwart von Ad-Myc unverändert

Eine mögliche Erklärung für das Absinken der Replikationsfähigkeit von dl309 in Anwesenheit von Ad-Myc liegt in einer Beeinflussung der Transkription der frühen Gene (E1A und E2A) durch Myc. Um dieser Frage nachzugehen, wurden HeLa Zellen mit dl309 und Ad-Myc oder Ad- β -Gal infiziert und nach 6, 8 oder 11 Stunden RNA isoliert bzw. Protein geerntet. Innerhalb der untersuchten Zeit werden die Gene für E1A und E2A transkribiert und Änderungen sollten sich via RT-PCR oder Western Blot nachweisen lassen.

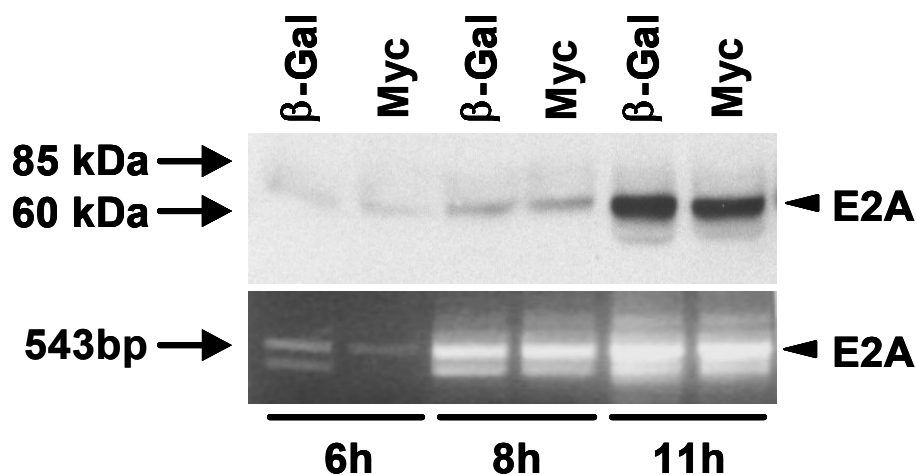


Abbildung 4.29: Auswirkung der Koinfektion mit dl309 und Ad-Myc oder Ad- β -Gal auf die mRNA- und Protein-Level von E2A. Je Ansatz wurden 2×10^5 HeLa Zellen mit dl309 (m.o.i.:1) und Ad-Myc oder Ad- β -Gal (m.o.i.:20) infiziert, bzw. transduziert. Für die Western Blot Analyse wurden die Proteine nach 24 Stunden in RIPA geerntet und über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem Antikörper gegen E2A gefärbt. Für die RT-PCR wurde 24 Stunden p.i. Gesamt-RNA präpariert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

In Abbildung 4.29 kann man erkennen, dass die Mengen an detektiertem E2A im Western Blot wie in der RT-PCR nur vernachlässigbar geringe Schwankungen aufweisen. Ad-Myc oder Ad- β -Gal haben also keinen Einfluss auf die Expression des frühen Proteins E2A. Ganz ähnlich verhält es sich mit den Mengen von E1A. In der Abbildung 4.30 lassen sich in der RT-PCR nach allen drei Zeitpunkten keine nennenswerten Veränderungen der Expressionslevel von E1A-mRNA zwischen Ad- β -Gal und Ad-Myc-infizierten Zellen beobachten.

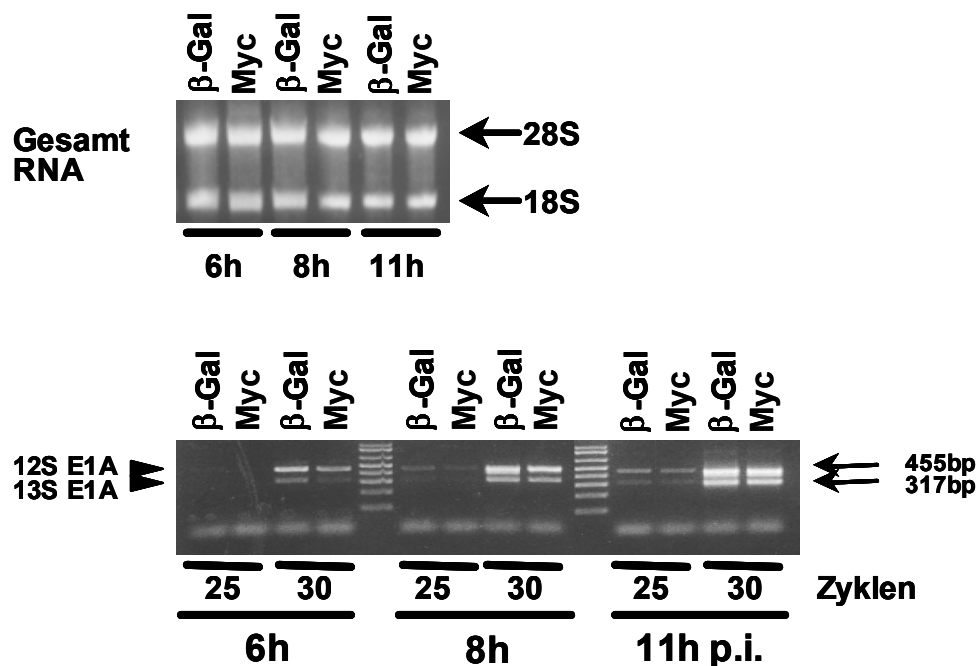


Abbildung 4.30: Auswirkung der Koinfektion mit dl309 und Ad-Myc oder Ad-β-Gal auf den mRNA-Level von E1A. Je Ansatz wurden 2×10^5 HeLa Zellen mit dl309 (m.o.i.:1) und Ad-Myc oder Ad-β-Gal (m.o.i.:20) infiziert, bzw. transduziert. 24 Stunden p.i. wurde Gesamt-RNA präpariert. Die mRNA wurde jeweils mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert. Es schloß sich die Amplifizierung der Fragmente über PCR mit nachfolgender Auftrennung über Agarosegelelektrophorese an.

Daraus läßt sich schließen, dass die Überexpression von Myc keinen direkten Einfluss auf die Transkription der frühen Gene E1A und E2A ausübt.

4.2.12 Die Bildung der Replikationszentren von dl309 wird durch die Überexpression von Myc inhibiert

Da die Replikationsfähigkeit des dl309-Virus in Gegenwart von überexprimiertem Myc stark herabgesetzt wird, stellte sich die Frage, welche Vorgänge während der Replikation von Myc negativ beeinflusst werden. Um herauszufinden, ob die Überexpression von Myc morphologische Veränderungen im Replikationszyklus von dl309 zu bewirken vermag, wurden Immunfluoreszenzen angefertigt. Es wurden HeLa-Zellen mit dl309 infiziert (m.o.i.:1) und jeweils mit einem Myc- oder β-Galactosidase-überexprimierendem Virus (jeweils m.o.i.:20) überinfiziert. Etwa 18 Stunden nach der Infektion wurden die Replikationszentren mit einem Antikörper gegen das adenovirale Protein E2A gefärbt.

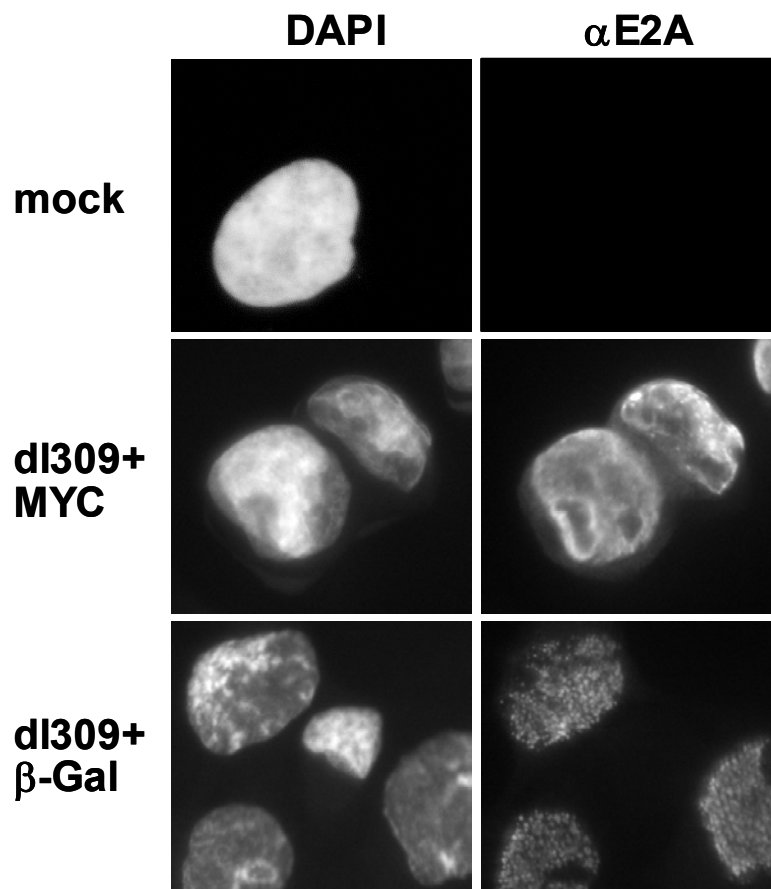


Abbildung 4.31: Veränderung der Replikationszentren bei Koinfektion mit Ad-Myc und Ad-β-Gal. HeLa-Zellen wurden mit dl309 (m.o.i.:1) und mit Ad-β-Gal oder Ad-Myc (jeweils m.o.i.:20) überinfiziert. 18 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen das adenovirale Protein E2A behandelt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit 4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI).

In Abbildung 4.31 sind die verschiedenen Verteilungsmuster von E2A unter den verschiedenen Infektionsbedingungen wiedergegeben. In den Zellen, die mit dl309 und Ad-β-Gal infiziert worden waren, konnten Replikationszentren in der gewohnten sphärischen Form und Anzahl (etwa 10 bis 30 pro Nukleus) beobachtet werden. In den Zellen, die zusätzlich zu dl309 mit einem Myc-exprimierenden Virus transduziert worden waren, hatte sich die Verteilung von E2A deutlich verändert: in der großen Mehrheit der Zellen waren keine distinkten Replikationszentren mehr zu sehen, sondern die E2A-Färbung war nunmehr diffus über den gesamten Nukleus verteilt. Ferner war in der DAPI-Färbung eine deutliche Kondensierung der DNA in bestimmte Areale des Nukleus zu beobachten.

E2A befindet sich nach Infektion mit Ad-Myc nicht mehr in distinkten Replikationszentren, wie sie sonst bei Ad-infizierten Zellen zu beobachten sind, sondern ist nunmehr diffus über den Zellkern verteilt. Es ist denkbar, dass sich die fehlende Intaktheit der Replikationszentren negativ auf die Replikationsfähigkeit des wildtypischen Virus auswirkt und es daher in Gegenwart von Ad-Myc zu sehr viel geringeren Titern heranwächst.

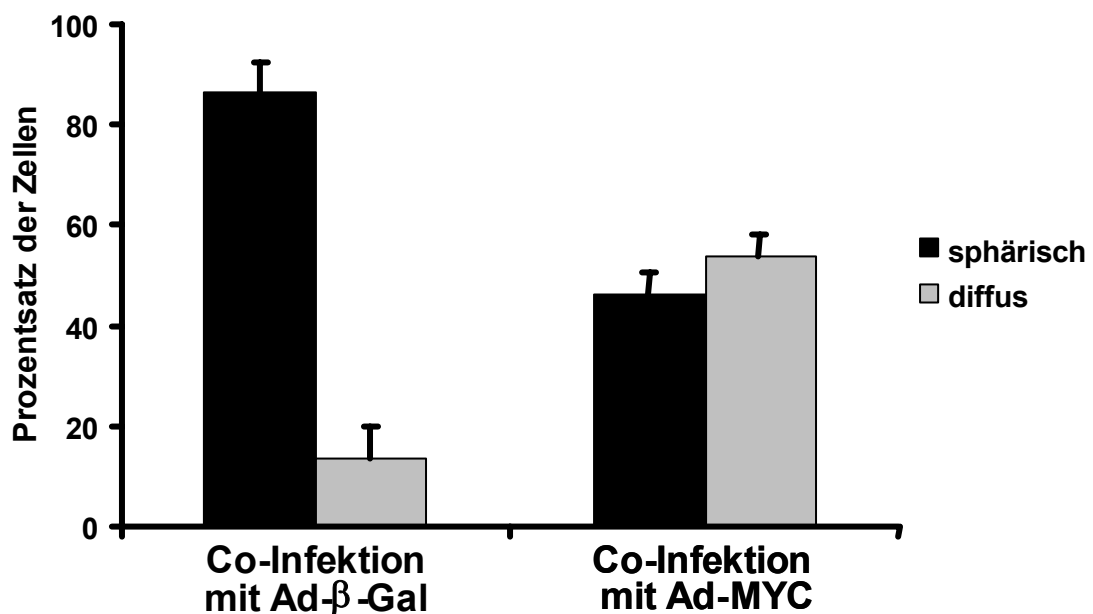


Abbildung 4.32: Veränderungen an der Bildung von Replikationszentren von Zellen, die mit dl309 und zusätzlich mit Ad-β-Gal oder Ad-Myc infiziert wurden. HeLa Zellen wurden mit dl309 (m.o.i.:1) und mit Ad-β-Gal oder Ad-Myc (jeweils m.o.i.:20) überinfiziert. 18 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen das adenovirale Protein E2A behandelt. Die Differenzierung zwischen den beiden Gruppen „sphärisch“ und „diffus“ wurde anhand der Anzahl der sichtbaren Replikationszentren getroffen: waren mehr als 10 distinkte Replikationszentren im Nukleus zu erkennen, so wurde eine Zelle zum „sphärischen“ Anteil gezählt.

In Abbildung 4.32 ist die Veränderung an der Bildung der Replikationszentren in Myc- oder β-Gal-infizierten Zellen ausgezählt worden und die Mengenverhältnisse sind graphisch dargestellt.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Transkriptionsfaktoren und adenoviralen Proteinen auf die zelluläre Transkription untersucht. Ein Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der Transkriptionsrepression, die durch den Tumorsuppressor p53 vermittelt wird. Der Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, konnte in weiten Teilen aufgeklärt werden und ist vor allem abhängig von p21, einem durch p53 induzierten Inhibitor zyklin-abhängiger Kinasen.

Ein weiterer Kernpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung des Einflusses, den die Adenovirusinfektion auf die zelluläre Transkription ausübt. Hier konnte gezeigt werden, dass es nur zu überraschend geringen Modulationen in der zellulären Genexpression kommt, und das am meisten durch die Infektion beeinflusste Gen – *Myc* – seinerseits auch die Replikation des Adenovirus negativ moduliert.

p21-vermittelte Repression

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion von p21 für die p53-vermittelte Repression nötig und hinreichend ist, nicht jedoch für das Einsetzen der Apoptose. Zur Vermittlung der Repression ist p21 nicht nur nötig, sondern auch hinreichend. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass p53 Gene dadurch reprimiert, dass es die Expression von p21 induziert.

Zur Vermittlung der p53-abhängigen Repression ist Apoptose nicht notwendig

In früheren Veröffentlichungen (Murphy et al., 1999; Sabbatini et al., 1995; Shen und Shenk, 1994) wurde berichtet, dass allein das Einsetzen der p53-induzierten Apoptose zur Repression einiger Gene führt. Weiterhin wurde postuliert, dass dies der einzige Mechanismus sei, welcher der Repression zu Grunde liege. Dies kann durch die vorliegenden Daten nicht bestätigt werden.

Vielmehr legen diese Daten den Schluß nahe, dass Repression und Apoptose klar voneinander entkoppelbare Phänomene sind. p53 reprimiert Transkription auch in Abwesenheit von Apoptose; andererseits kann p53 auch in p21-losen Zellen Apoptose induzieren (Bunz et al., 1998; Chan et al., 2000), obwohl dort keine Repression mehr möglich ist. Dies steht im Kontrast zu früheren Veröffentlichungen,

bei denen z. B. Murphy *et al.* noch davon ausgingen, dass die p53-vermittelte Repression eine Vorbedingung zum Einleiten der Apoptose sei.

Von Sabbatini (Sabbatini *et al.*, 1995) wird weiterhin die Ansicht geäußert, dass die p53-induzierte transkriptionelle Aktivierung durch einen Inhibitor der Apoptose (E1B-19kDa) gesteigert, sowie die transkriptionelle Repression aufgehoben werden kann. Bei Vergleich mit den in dieser Arbeit vorgelegten Daten muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die von Sabbatini *et al.* beobachteten Effekte lediglich auf einsetzende Apoptose, bewirkt durch sehr hohe p53-Mengen in der Transfektion (5µg Expressionsplasmid), zurückzuführen sind. Durch die apoptoseinduzierende Wirkung von p53 kann beinahe jeder Promoter, abhängig nur von der Menge des exprimierten p53, reprimiert werden (eigene unveröffentlichte Beobachtungen). Dieser Zusammenhang ist darauf zurückzuführen, dass eine Zelle während des programmierten Zelltodes nicht mehr in der Lage ist, effizient zu transkribieren. Es handelt sich nicht um einen p53-spezifischen Effekt.

p53 bindet nicht direkt an die Promotoren der reprimierten Gene

Diese Analyse des *Survivin*-Promoters legt nahe, dass keine p53-Konsensus-Sequenz nötig ist, um die Repression durch p53 zu ermöglichen. Diese Daten befinden sich in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die meisten Gene, die durch p53 reprimierbar sind, keine klassische p53-Konsensus-Sequenz haben (Mirza *et al.*, 2002). Schon früher wurde darauf hingewiesen, dass die p53-vermittelte Repression auf eine Konkurrenz bezüglich der Komponenten der basalen Transkriptionsinitiationsmaschinerie zurückzuführen sei, also lediglich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen und nicht auf Interaktionen mit der DNA (Bargonetti *et al.*, 1997; Borellini und Glazer, 1993; Martin *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1992).

Andererseits stehen diese Daten im Kontrast zu Veröffentlichungen, in denen postuliert wurde, dass eine Entfernung der drei Nukleotide zwischen den einzelnen Hälften der vermeintlichen p53-Konsensus-Sequenz zu einer plötzlichen Aktivierbarkeit des Promoters durch p53 führen könne (Hoffman *et al.*, 2002). An anderer Stelle wurde jedoch ebenfalls die Meinung vertreten, dass eine Bindung von p53 an den *Survivin*-Promoter zur Vermittlung der Repression nicht nötig ist (Mirza *et al.*, 2002). Aus den Promoterstudien, wie auch aus den Reporterassays kann der

Schluß gezogen werden, dass durch Entfernung der drei Nukleotide zwischen den beiden p53 *half sites*, aus einer nicht responsiven p53 Konsensus-Sequenz, eine durch p53 aktivierbare Bindestelle geschaffen wurde. Während p53-Bindestelle vorher keinen Einfluss auf die Repression des Genes hatte, überkompensiert deren p53-abhängige Aktivierbarkeit nach der Entfernung der drei Nukleotide die immer noch vorhandene Repression durch p53. In der wildtypischen Sequenz des *Survivin*-Promoters besitzt die p53-Konsensus-Sequenz keine Funktionalität und verändert die transkriptionelle Regulation des Genes weder in positive noch in negative Richtung.

p21 ist zur p53-vermittelten Repression nötig und hinreichend

p21 vermittelt die Repression dadurch, dass es zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) inhibiert. Dies führt zur Akkumulation von hypophosphorylierten Rb-Proteinen, welche in der Lage sind, Transkriptionsfaktoren aus den Familien DP und E2F gebunden zu halten. Diese können dadurch nicht aktiv werden, was einer Repression von E2F-responsiven Promotoren nach sich zieht (Muller und Helin, 2000). Diese Theorie wird durch verschiedene Daten in der Literatur unterstützt: so ist z.B. für *Stathmin* beschrieben worden, dass es durch p53 reprimierbar ist (Ahn et al., 1999; Johnsen et al., 2000), gleichzeitig findet man in der Literatur aber auch Belege für eine Induktion dieses Genes durch E2F (Ishida et al., 2001). Gleiches gilt für die Zellzyklusregulatoren *Cyclin A2* und *Cyclin B1*, *TOP2 α* und *CDC2*. Bei all diesen Genen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sie sowohl durch Überexpression von p53, als auch durch p21 allein, reprimiert werden können. Gleichzeitig ist in allen Fällen entweder eine Repression durch Rb oder eine Induktion durch E2F beschrieben worden, siehe Tabelle 5.1. Ähnliches gilt für die Gene *CDC25C* und *CHEK1*: von ihnen ist neben der Repression durch p53 auch eine Promoterassoziation mit E2F-Proteinen beschrieben worden, was sich ebenfalls im Einklang mit dem dargelegten Szenario befindet.

Gen	Referenzen, die negative Regulation durch p53 beschreiben	Referenzen, die Induktion durch E2F oder Repression durch pRb beschreiben	Referenzen, die Promoterassoziation mit E2F Proteinen beschreiben
BRCA1	(Arizti et al., 2000; MacLachlan et al., 2000)		
CDC2	(Yun et al., 1999)	(Ishida et al., 2001; Markey et al., 2002)	(Ren et al., 2002)
CDC25C	(Badie et al., 2000; Krause et al., 2001; Manni et al., 2001)		(Weinmann et al., 2002)
CHEK1	(Damia et al., 2001; Gottifredi et al., 2001)		(Ren et al., 2002)
Cyclin A2	(Badie et al., 2000)	(Ishida et al., 2001; Markey et al., 2002)	(Ren et al., 2002)
Cyclin B1	(Badie et al., 2000; Innocente et al., 1999; Krause et al., 2000; Manni et al., 2001)	(Ishida et al., 2001)	
LBR	(Zhao et al., 2000)		
POLD1	(Li und Lee, 2001)		(Ren et al., 2002)
Stathmin	(Ahn et al., 1999; Johnsen et al., 2000; Murphy et al., 1999)	(Ishida et al., 2001)	
Survivin	(Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002)		
Top 2 alpha	(Badie et al., 2000; Zhao et al., 2000)	(Ishida et al., 2001; Markey et al., 2002)	(Ren et al., 2002)

Tabelle 5.1: Gene, die durch p53 negativ reguliert werden.

Der Transkriptionsfaktor E2F1 wird durch den p53-Antagonisten mdm2 induziert (Wunderlich und Berberich, 2002). Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass der Transkriptionsaktivator E2F durch p53 zu einem Repressionsfaktor werden kann.

Durch genotoxischen Stress wird eine Repression von *Stathmin* hervorgerufen. Diese kann durch die Expression einer dominant negativen E2F-Mutante ebenso aufgehoben werden, wie durch das E6 Protein des Humanen Papilloma Virus (HPV), welches Rb bindet und inaktiviert. Diese Beobachtung untermauert ebenfalls die Hypothese, dass die p53-vermittelte Repression über Rb und E2F verläuft (Polager und Ginsberg, 2002).

Transkriptionsrepression durch p53 - biologische Konsequenzen

Da in den Zellen, in denen kein p21 mehr vorhanden ist, ohne Probleme Apoptose induziert werden kann, ohne die hier untersuchten Gene zu beeinflussen (Bunz et al., 1998; Chan et al., 2000), liegt der Schluß nahe, dass die Repression keine Vorbedingung zur Induktion der Apoptose ist. Die p53-vermittelte Repression spielt also keine pro-apoptotische Rolle, wie vormals behauptet (Maheswaran et al., 1995; Murphy et al., 1996; Sabbatini et al., 1995; Shen und Shenk, 1994).

Survivin ist fähig, die Apoptose zu inhibieren (Ambrosini et al., 1997; Mirza et al., 2002), wenn es überexprimiert wird und ist durch p53 reprimierbar (Hoffman et al., 2002). Aus den vorliegenden Daten kann jedoch nicht abgeleitet werden, dass die Repression von *Survivin* zur Induktion der Apoptose notwendig ist. Daraus läßt sich folgern, dass p53 die Apoptose eher durch Induktion von pro-apoptotischen Genen auslöst, als durch Repression von Apoptose-Inhibitoren.

Der Zellzyklusarrest durch p21 kann in den Phasen G₁ und G₂ ausgelöst werden. Der p53-vermittelte G₂-Arrest tritt in Abwesenheit von p21 nicht auf (Bunz et al., 1998). *Survivin* kann also nicht nur die Apoptose inhibieren, sondern auch die Mitose einleiten (Giodini et al., 2002). Die negative Regulation einiger Gene, darunter *Survivin*, ist also wahrscheinlich für das Einsetzen des G₂-Arrest wichtig, während es für die Induktion der Apoptose keine Bedeutung hat. Eine Überexpression von *Cyclin B1* oder einer dominant negativen Mutante von *CDC2* kann den durch p53 ausgelösten G₂-Arrest kompensieren (Park et al., 2000). Diese Tatsache zeigt, dass die Repression von *Cyclin B1* und *CDC2* durch p53 und durch p21 nötig ist, um den p53-abhängigen G₂-Arrest auszulösen.

Sowohl p53 als auch p21 werden zur Einleitung des G₂-Arrestes nach DNA-Schäden benötigt (Bunz et al., 1998). In Abwesenheit von p21 kommt es zur mitotischen Katastrophe, d.h. die Zelle versucht vergeblich, in die Mitose einzutreten.

Wenn p53 in der Lage ist, bestimmte Gene durch einen indirekten Mechanismus über die Induktion eines Effektorgenes zu reprimieren, könnte dieser Mechanismus auch für einige der p53-induzierbaren Gene verantwortlich sein. Demnach könnte eine Gruppe von p53-induzierbaren Genen nicht durch p53 direkt, sondern durch einen von p53 induzierten Transkriptionsfaktor in ihrer Expression verstärkt werden. Ein mögliches Beispiel für einen solchen Mechanismus der indirekten Aktivierung

wäre das Gen *insulin-like growth factor binding protein 3*: dessen Genprodukt interferiert mit dem *insulin-like growth factor* Signalweg und der sich daraus ergebenden transkriptionellen Aktivierung (Buckbinder et al., 1995).

Weitere Mechanismen der Repression

Obwohl p21 bei der Vermittlung der Repression die Hauptrolle zu spielen scheint, weist die unterschiedliche Reprimierbarkeit der getesteten Gene durch p21 darauf hin, dass es eventuell noch andere Mediatoren der p53-abhängigen Repression geben könnte. Ein möglicher Kandidat hierfür ist das Protein mSin3a. Es wurde 1999 von Murphy *et al.* als Vermittler der p53-abhängigen Repression beschrieben. Als Evidenz für seine Bedeutung bei der Repressionsvermittlung geben Hoffman *et al.* an, dass die Deletion der mSin3a Bindestelle innerhalb von p53 zu einer Aufhebung der Reprimierbarkeit von *Survivin* durch das mutierte p53 führt (Hoffman et al., 2002). Die kartierte mSin3a Bindestelle ist hierbei jedoch weitgehend identisch mit der Deltapro-Domäne von p53 (mSin3a Bindestelle wird mit AA61-75 angegeben, die Deltapro-Domäne erstreckt sich von AA61 bis AA92). Von dieser Domäne ist bekannt, dass sie p21 sehr viel schlechter induziert als wildtypisches p53, womit sich die zurückgehende Repression bei Deletion dieses Molekülabschnittes sehr leicht erklären ließe.

Kurz nach der Entdeckung von p53 wurde über eine sehr große Anzahl verschiedener Aktivitäten dieses Proteins *in vivo* wie auch *in vitro* berichtet. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch unklar, welche der beobachteten Aktivitäten für die Tumorsuppressorfunktion von p53 nötig waren (Harris, 1996). Durch *knock-in*-Studien konnte gezeigt werden, dass eine keimbahngängige Mutation der aminoterminalen Domäne von p53 bei Mäusen zu einem Phänotyp führt, der von *p53*^{-/-} Mäusen nicht zu unterscheiden ist (Chao et al., 2000; Jimenez et al., 2000). Die Funktion der aminoterminalen Domäne ist demnach für alle biologisch relevanten Aktivitäten von p53 essentiell. Die biochemische Funktion, die hinter der Aktivität der aminoterminalen Domäne steht (Transaktivierung oder Repression), blieb jedoch lange Zeit unklar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Repression verschiedener Gene durch p53 das Ergebnis eines indirekten und durch p21 ausgelösten Effektes

sind. Es wäre somit möglich, dass die komplexen biologischen Aktivitäten von p53 ausschließlich auf seine transaktivierenden Eigenschaften zurückzuführen sind.

Gegenseitige Beeinflussung von Adenovirusinfektion und Expression von Myc

Es konnte gezeigt werden, dass während der Adenovirusinfektion zelluläre Gene nur in begrenzter Anzahl differentiell reguliert werden. Die meisten diese Gene werden negativ reguliert, also reprimiert, unter ihnen *Myc*. Diese negative Regulation war teilweise abhängig von E1B-55kDa, E4orf6 und der DNA-Replikation. Während die mRNA-Level von *Myc* im Laufe der Infektion immer reprimiert wurden, gilt dies nicht für die Proteinlevel. Der Grund hierfür scheint die Stabilisierung des *Myc* Proteins durch die Adenovirusinfektion zu sein. Dieser Effekt ist vor allem auf das adenovirale E1A-Protein zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung ist, dass E1A als Nebeneffekt seiner wachstumsstimulierenden Wirkung *Myc* stabilisieren kann, während das Virus Mechanismen entwickelt hat, die Level von *Myc* auf mRNA-Ebene gering zu halten. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass überexprimiertes *Myc* die Virusreplikation und die Ausbildung von Replikationszentren hemmt.

Von einer Reihe von Genen ist bekannt, dass sie im Laufe der Adenovirusinfektion differentiell reguliert werden. In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Ergebnissen befindet sich die Beobachtung, dass in KB-Zellen, die mit Adenovirus Typ 2 infiziert wurden, *Myc* ebenfalls reprimiert wurde (Rosahl und Doerfler, 1992).

Eine weitere Studie (Haberberger et al., 2000) benutzte ebenfalls die Arraytechnologie, um die Veränderungen der Transkription von zellulären Genen nach Infektion mit einem Adenovirus zu untersuchen. In diesem Falle wurde eine weitaus geringere Anzahl an Genen untersucht (588 anstatt wie hier 4600), die das Verhalten von murinen Leberzellen nach Transduktion mit einem replikationsunfähigem Adenovirus beschrieben. Mit dem hier benutzten System hat das relativ wenig gemeinsam, und so verwundert es wenig, dass die dort differentiell reguliert gefundenen Gene vor allem mit der Interferonantwort verbunden sind. Diese differentielle Regulation könnte eher auf den indirekten Effekt der Virusinfektion und

die darauf folgende Immunantwort zurückzuführen sein als auf eine direkte Virus-Zell-Wechselwirkung.

Die Auswahl der untersuchten Zellen beeinflusst selbstverständlich die Zusammensetzung der durch die Adenovirusinfektion differentiell regulierten Gene. Primäre Zellen zum Beispiel werden stärker auf die transformierenden Proteine (wie E1 oder E4) reagieren als schon transformierte Tumorzellen, die bereits genetische Veränderungen innerhalb der zellulären Mechanismen zur Wachstumskontrolle aufweisen. Die hier beschriebenen Experimente zielten vor allem darauf ab, Veränderungen zu untersuchen, die in den infizierten Zellen vor sich gehen, wenn das Adenovirus von der frühen in die späte Phase der Replikation übergeht. In dieser Phase bilden sich Replikationszentren im Kern der Zelle aus, und nicht-transformierende virale Transkriptionsfaktoren wie IV2a werden in hohem Maße exprimiert. Ein Einfluss dieser zellfremden Transkriptionsfaktoren auf die zelluläre Transkriptionsmaschinerie wäre durchaus denkbar.

Zur Zeit ist nicht bekannt, durch welche Mechanismen die Adenovirusinfektion die hier gefundenen Gene reprimiert. Da ein Inhibitor der Virusreplikation (AraC) die Repression aufheben kann, liegt die Vermutung nahe, dass der Beginn der späten Phase eine Voraussetzung für die hier gefundene Regulation dieser Gene ist. Möglicherweise absorbieren die Replikationszentren Transkriptionsfaktoren, die andernfalls die effektive Transkription dieser Gene ermöglicht hätten. In diesem Fall wäre es jedoch erstaunlich, dass nicht noch mehr zelluläre Gene davon beeinflusst werden. Wenn einige zelluläre Transkriptionsfaktoren durch die Adenovirusinfektion in einem Maße von ihren Zielgenen entfernt werden, dass deren Aktivität an zellulären Genen deutlich abgesenkt wird, so legt dies die Vermutung nahe, dass diese Transkriptionsfaktoren nur für eine relativ kleine Anzahl zellulärer Promotoren wichtig und notwendig sind. Da das Adenovirus also die überwiegende Mehrheit der zellulären Gene während der Infektion nicht beeinflusst, scheint die kontinuierlich fortlaufende zelluläre Transkription für die Replikation des Virus nicht von Nachteil zu sein. Dieser Umstand könnte zumindest teilweise damit erklärt werden, dass das Adenovirus dazu in der Lage ist, die zelluläre Genexpression auf dem Level der Translation zu blockieren. Diese Translationsinhibition geht von den Proteinen E1B-55kDa und E4orf6 aus, die einen negativen Einfluss auf den mRNA Export und die Translation haben (Babiss et al., 1985; Beltz und Flint, 1979; Halbert et al., 1985;

Pilder et al., 1986; Shenk, 1996). Einige zelluläre mRNAs scheinen jedoch in der Lage zu sein, diese Blockade zu umgehen und werden trotzdem in Protein translatiert (Yang et al., 1996). Dies scheint nicht mit der Adenovirusreplikation zu interferieren.

Ein direkter Effekt von E1A auf MYC wurde schon früher beschrieben, in manchen Fällen wurde eine Repression (Dion et al., 1992; Rosahl und Doerfler, 1992; van Dam et al., 1989), in anderen eine erhöhte Expression (Hiebert et al., 1989; Lipp et al., 1989; Thalmeier et al., 1989) berichtet. Die meisten dieser Studien beschränkten sich jedoch auf transiente Promoteranalysen. Diese Assays sind nur bedingt aussagekräftig, weil sie nicht in letzter Konsequenz die Regulation eines chromosomal integrierten Genes nachstellen können. Außerdem enthalten die Reporterkonstrukte, wegen des begrenzten Platzes, oft nur einige der Regulationselemente, die zur vollständigen Kontrolle der Genexpression nötig wären. In der hier präsentierten Arbeit war E1A alleine nicht in der Lage, MYC auf mRNA-Level zu reprimieren.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei E1A um einen Faktor handelt, der die Stabilisation von MYC vermitteln kann. Dabei bleibt jedoch die Frage offen, welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist. Kartierungsstudien legen nahe, dass verschiedene Aktivitäten von E1A zusammenarbeiten, um diesen Effekt zu erreichen. E1A interagiert mit dem transkriptionellen Co-Aktivator p300, der auch die Funktion einer Acetyltransferase ausführen kann. Es ist denkbar, dass eine Interaktion von E1A und p300 zu einer Änderung der Stabilität von MYC führt. Dieses Modell wird dadurch gestützt, dass eine Depletion von p300 zur Anhebung der MYC-Level führt (Kolli et al., 2001). In unseren Händen jedoch war eine E1A-Mutante, der die Fähigkeit zur Bindung von p300 fehlte, weiterhin in der Lage, MYC zu stabilisieren (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Bindungsfaktor beider Proteine ist p400/TRRAP (Fuchs et al., 2001; McMahon et al., 1998). Zieht man die beträchtlichen Ähnlichkeiten zwischen Myc und E1A in Betracht, so drängt sich der Schluss auf, dass E1A die Stabilität von Myc durch Konkurrenz mit einem oder sogar mehreren Myc-Bindungspartnern beeinflussen kann. Diese Bindungspartner könnten unter anderem für die Ubiquitinylierung von Myc sorgen.

Der inhibitorische Effekt, der von der Myc-Überexpression auf die Replikation des Adenovirus ausgeht, lieferte eine sehr logische Erklärung für die Tatsache, dass das

Adenovirus Mechanismen entwickelt hat, dieses Gen negativ zu regulieren. Der genaue Mechanismus, wie dies geschieht, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die frühe Genexpression des Adenovirus durch die Überexpression von Myc nur marginal gestört wird. Anders die DNA-Replikation: diese wird durch Myc sehr negativ beeinflusst. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass die Bildung von Replikationszentren in Gegenwart von Myc stark beeinträchtigt ist. Eine Beteiligung von Myc an der Regulation der Replikation zellulärer DNA wurde schon früher beschrieben: beispielsweise durch Assoziation mit den Enzymen der DNA-Replikation (Studzinski et al., 1991) oder durch Bindung an p21/CIP1/WAF1. Hierbei nimmt Myc den Platz des Faktors PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) ein und verdrängt diesen aus der Bindung (Kitauro et al., 2000). Interessanterweise kann man bei SV40 (*simian vacuolation virus 40*) einen gegenteiligen Effekt von Myc auf die DNA-Replikation feststellen: sie steigt in Anwesenheit von Myc um das zehnfache (Classon et al., 1987). Im Gegensatz zu SV40 benutzt das Adenovirus zur Replikation seines Genomes jedoch eine vom Virus selbst kodierte Polymerase und keine zellulären Proteine. Daher ist es möglich, dass die Bedingungen, die zur erfolgreichen Replikation des Genomes vorhanden sein müssen, in bedeutendem Maße von denjenigen abweichen, wie sie für SV40 ideal sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Myc mit einigen Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie, die vom Virus genutzt werden, interagiert und auf diesem Wege deren Funktion ausschaltet.

Die hier präsentierten Daten beleuchten ein sehr komplexes Wechselspiel zwischen der Replikation des Adenovirus und der Expression von Myc: Es handelt sich bei Myc nicht nur um eines der wenigen Gene, die durch die Adenovirusinfektion merklich in ihrer Expression verändert, bzw. in diesem Falle reprimiert werden, sondern Myc wird auf dem Proteinlevel durch die Infektion stabilisiert und ist seinerseits in der Lage, die DNA-Replikation des Adenovirus negativ zu beeinflussen.

6. Zusammenfassung

Die zelluläre Genexpression kann durch verschiedene Einflüsse moduliert werden. Beispiele hierfür sind zelleigene Wachstumsregulatoren auf der einen Seite und Viren als von außen auf die Zelle einwirkende Agenzien auf der anderen Seite.

Der erste Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Analyse der Transkriptionsmodulation durch einen zelleigenen Wachstumsregulator. Das Tumorsuppressorprotein p53 kann die Transkription, abhängig vom untersuchten Gen, sowohl in negativer wie auch in positiver Weise regulieren. Der Mechanismus der p53-vermittelten Transkriptionsaktivierung ist gut aufgeklärt und durch eine Bindung von p53-Tetrameren an die DNA eines p53-responsiven Promoterelementes gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu liegt der Mechanismus der p53-vermittelten Repression weitestgehend im Dunkeln. Frühere Veröffentlichungen beschreiben eine Aufhebung der Repression durch Zugabe von Inhibitoren der Apoptose und legten damit einen kausalen Zusammenhang zwischen p53-vermittelter Repression und der Induktion des programmierten Zelltodes nahe. In jüngerer Zeit wurde die Repression bestimmter Gene, darunter *Survivin* und *Stathmin*, eher durch direkte Interaktion des jeweiligen Promoters mit p53 erklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die p53-vermittelte Repression nicht von der Induktion der Apoptose abhängt, sondern dass es sich hier um zwei von einander entkoppelte Phänomene handelt. Die Repression kann nicht nur durch p53, sondern ebenfalls durch p73, ein Homolog von p53, ausgelöst werden. Allerdings ist sie in allen Fällen abhängig von einer intakten Transaktivierungsdomäne. Die Notwendigkeit einer solchen Domäne legte die Vermutung nahe, dass die transkriptionelle Aktivierung eines Effektor-Gens für die Vermittlung der Repression nötig sein könnte. Als solches Effektor-Gen kommt p21/CDKN1A in Frage, da es nicht nur von p53 induziert wird, sondern als ein Inhibitor zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) auch die Expression von E2F-abhängigen Genen unterbinden kann. In Zellen, in denen *p21* deletiert war, konnte die Repression nicht mehr beobachtet werden. In *p53*^{-/-}-Zellen hingegen war überexprimiertes p21 in der Lage, alle untersuchten Gene zu reprimieren. p21 ist also zur Vermittlung der Repression nicht nur nötig, sondern auch hinreichend. Überexprimiertes Myc ist ebenfalls in der Lage, mit der p53-vermittelten Repression zu interferieren. Myc kann die Induktion von p21 durch p53 erfolgreich inhibieren und

dadurch die Repression aufheben. Die p53-vermittelte Repression ist also abhängig von p21/CDKN1A und kann durch Myc aufgehoben werden.

In dem zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, wie ein replikationsfähiges Tumovirus in das Gefüge der zellulären Transkription eingreifen kann. Während der Adenovirusinfektion werden in der Transkription des Virusgenomes Veränderungen beobachtet, die so massiv sind, dass sie sich auch auf die zelluläre Transkription auswirken könnten. Um den Einfluss auf die zelluläre Transkription nach der Infektion mit Adenovirus Typ 5 (Stamm dl309) in HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden cDNA-Arrays verwendet. Überraschenderweise fanden sich von den 4600 analysierten Genen (davon waren 1200 reproduzierbar oberhalb des Hintergrundes exprimiert) nur etwa 20, deren Expression durch die Adenovirusinfektion, verglichen mit mock infizierten Zellen, mehr als zweifach verändert wurde. Die Menge an *Myc* mRNA war in infizierten Zellen besonders stark reduziert (3.7-fach). Diese Repression von *Myc* auf mRNA-Ebene ist teilweise abhängig von den frühen Genprodukten E1B-55kDa und E4orf6, nicht aber von E4orf3. Im Gegensatz zur mRNA wurden die Proteinmengen von Myc während der Adenovirusinfektion durch Stabilisierung des Proteins konstant gehalten. Das frühe Protein E1A ist hierfür nötig und hinreichend. Diese Stabilisierung könnte durch eine Kompetition von Myc und E1A um zelluläre Bindungspartner zustande kommen, der genaue Mechanismus ist bisher jedoch unklar. Eine Überexpression von Myc hatte auf die Replikation des Adenovirus dl309 einen stark inhibierenden Effekt und führte zu einer veränderten Morphologie der Replikationszentren in HeLa Zellen. Es wäre denkbar, dass das Adenovirus einen negativen Einfluss auf die mRNA Synthese von *Myc* entwickelt hat, da anderenfalls Myc der Replikation des Adenovirus entgegenwirkt.

7. Abstract

The cellular gene expression pattern can be altered by various impacts. Examples include cellular growth regulators as well as viruses.

The first emphasis of the presented work was about alteration of transcription by a cellular growth regulator. The tumor suppressor p53 regulates transcription positively and negatively, depending on the target gene. Whereas p53 induces transcription through direct interaction with promoter DNA, the mechanism of p53-mediated transcriptional repression is less well understood. Early reports described the alleviation of p53-mediated repression by inhibitors of apoptosis, suggesting a causal relation between repression and programmed cell death. More recently, it has been proposed that certain genes, such as *stathmin* and *survivin*, are repressed by direct interaction of p53 with their promoters, followed by engagement of a repressor complex. We show here that p53-mediated negative regulation of transcription could occur independently of apoptosis. Besides p53, its homologue p73 diminished the expression of *survivin* and *stathmin*, but only when isoforms of p73 were expressed that contain a transactivation domain. This raised the hypothesis that activation of an effector gene might be required for the negative regulation of other genes by p53 and its homologue. Strikingly, when the p53-inducible *p21/CDKN1A* gene was deleted, p53 no longer repressed any one among 11 genes that it normally downregulates. Further, overexpressed c-MYC not only prevented the transcription of *p21/CDKN1A* but also impaired p53-mediated repression. Taken together, these results strongly suggest that induction of *p21/CDKN1A* is required for the negative regulation of gene expression by p53.

The second part of the thesis addresses the question in which way a replication competent adenovirus can affect cellular transcription. During infection with adenovirus, massive changes in the transcription of virus genes are observed, suggesting that the expression of cellular genes may also be affected. cDNA arrays were screened to characterize the levels of cellular mRNA species in HeLa cells, 24 hours after infection with wild type adenovirus type 5, strain dl309. Surprisingly, less than 20 cellular genes (out of 4600 analyzed and 1200 found detectable) were altered more than 2-fold in their corresponding mRNA levels, when compared to mock-infected cells. In particular, the amount of c-MYC mRNA was reduced. This

reduction was dependent on the adenovirus E1B-55 kDa and E4orf6 but not the E4orf3 gene products. On the other hand, c-MYC protein showed an increased half-life in infected cells, resulting in roughly constant steady-state protein levels. The adenovirus E1A protein is necessary and sufficient to stabilize c-myc. Overexpression of c-MYC had a strong inhibitory effect on adenovirus replication and, correspondingly, led to a distorted morphology of the virus replication centers. We conclude that adenovirus infection leads to the stabilization of c-MYC, perhaps as a result of competition between E1A and c-myc for cellular binding partners. On the other hand, *c-MYC* mRNA synthesis is negatively regulated during adenovirus infection, thereby avoiding the detrimental effect of excessive c-MYC on adenovirus replication.

8. Abkürzungen

Neben den international gültigen chemischen Symbolen und physikalischen Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
β -Gal	β -Galactosidase
BSA	bovines Serumalbumin
Da	Dalton
DAPI	4,6'-Diamidino-2-phenylindole
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithioerytol
E. choli	Escherichia choli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
HeLa	Helene Lang
Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani broth medium
mM	milimolar
M.O.I.	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten RNA
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinase
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Lösung
TB	Terrific broth
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Aktivitätseinheit

9 Literatur

Ahn, J., Murphy, M., Kratowicz, S., Wang, A., Levine, A. J., and George, D. L. (1999). Down-regulation of the stathmin/Op18 and FKBP25 genes following p53 induction. *Oncogene* 18, 5954-8.

Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-21.

Andersen, S. S., Ashford, A. J., Tournebize, R., Gavet, O., Sobel, A., Hyman, A. A., and Karsenti, E. (1997). Mitotic chromatin regulates phosphorylation of Stathmin/Op18. *Nature* 389, 640-3.

Arizti, P., Fang, L., Park, I., Yin, Y., Solomon, E., Ouchi, T., Aaronson, S. A., and Lee, S. W. (2000). Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression. *Mol Cell Biol* 20, 7450-9.

Babiss, L. E., Ginsberg, H. S., and Darnell Jr., J. E. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol* 5, 2552-2558.

Badie, C., Itzhaki, J. E., Sullivan, M. J., Carpenter, A. J., and Porter, A. C. (2000). Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells. *Mol Cell Biol* 20, 2358-66.

Bargonetti, J., Chicas, A., White, D., and Prives, C. (1997). p53 represses Sp1 DNA binding and HIV-LTR directed transcription. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 43, 935-49.

Barker, D. D., and Berk, A. J. (1987). Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* 156, 107-21.

Beltz, G. A., and Flint, S. J. (1979). Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol* 131, 353-373.

Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-3.

Bergelson, J. M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M. S., Wickham, T., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 72, 415-9.

Berget, S. M., Moore, C., and Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3171-5.

Borellini, F., and Glazer, R. I. (1993). Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *J Biol Chem* 268, 7923-8.

Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., and Vingron, M.

(2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29, 365-71.

Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.

Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R., and Kley, N. (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377, 646-9.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-501.

Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616-20.

Chan, T. A., Hwang, P. M., Hermeking, H., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2000). Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev* 14, 1584-8.

Chao, C., Saito, S., Kang, J., Anderson, C. W., Appella, E., and Xu, Y. (2000). p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *Embo J* 19, 4967-75.

Chen, X., Bargonetti, J., and Prives, C. (1995). p53, through p21 (WAF1/CIP1), induces cyclin D1 synthesis. *Cancer Res* 55, 4257-63.

Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., and Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1-8.

Classon, M., Henriksson, M., Sumegi, J., Klein, G., Hammarskjold, M. L., and Hammaskjold, M. L. (1987). Elevated c-myc expression facilitates the replication of SV40 DNA in human lymphoma cells. *Nature* 330, 272-4.

Contente, A., Dittmer, A., Koch, M. C., Roth, J., and Dobbelstein, M. (2002). A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nat Genet* 30, 315-20.

Damia, G., Sanchez, Y., Erba, E., and Broggin, M. (2001). DNA Damage Induces p53-dependent Down-regulation of hCHK1. *J Biol Chem* 276, 10641-5.

Deveraux, Q. L., and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-52.

Dion, P. A., Fleurent, J., Roberge, D., and Weber, J. M. (1992). Reduction of c-myc expression correlated with E1a expression but not with the transformed phenotype. *Virus Res* 26, 231-40.

Dobbelstein, M., Arthur, A. K., Dehde, S., van Zee, K., Dickmanns, A., and Fanning, E. (1992). Intracistronic complementation reveals a new function of SV40 T antigen that co-operates with Rb and p53 binding to stimulate DNA synthesis in quiescent cells. *Oncogene* 7, 837-47.

Einfeld, D. A., Schroeder, R., Roelvink, P. W., Lizonova, A., King, C. R., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. (2001). Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol* 75, 11284-91.

Fallaux, F. J., Kranenburg, O., Cramer, S. J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R. C., and Van Der Eb, A. J. (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7, 215-22.

Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W. S., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* 106, 297-307.

Funk, J. O., and Galloway, D. A. (1998). Inhibiting CDK inhibitors: new lessons from DNA tumor viruses. *Trends Biochem Sci* 23, 337-41.

Giodini, A., Kallio, M. J., Wall, N. R., Gorbsky, G. J., Tognin, S., Marchisio, P. C., Symons, M., and Altieri, D. C. (2002). Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 62, 2462-7.

Goodrum, F. D., Shenk, T., and Ornelles, D. A. (1996). Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells. *J Virol* 70, 6323-35.

Gottifredi, V., Karni-Schmidt, O., Shieh, S. S., and Prives, C. (2001). p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 21, 1066-76.

Haberberger, T. C., Kupfer, K., and Murphy, J. E. (2000). Profiling of genes which are differentially expressed in mouse liver in response to adenoviral vectors and delivered genes. *Gene Ther* 7, 903-9.

Halbert, D. N., Cutt, J. R., and Shenk, T. (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol* 56, 250-257.

Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic - and abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17, 1187-1198.

He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-14.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.

Hiebert, S. W., Lipp, M., and Nevins, J. R. (1989). E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3594-8.

Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J., and Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277, 3247-57.

Hofmann, T. G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M. L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4, 1-10.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551-5.

Horikoshi, N., Usheva, A., Chen, J., Levine, A. J., Weinmann, R., and Shenk, T. (1995). Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15, 227-34.

Innocente, S. A., Abrahamson, J. L., Cogswell, J. P., and Lee, J. M. (1999). p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2147-52.

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J. R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21, 4684-99.

Jeffrey, P. D., Gorina, S., and Pavletich, N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498-502.

Jimenez, G. S., Nister, M., Stommel, J. M., Beeche, M., Barcarse, E. A., Zhang, X. Q., O'Gorman, S., and Wahl, G. M. (2000). A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat Genet* 26, 37-43.

Johnsen, J. I., Aurelio, O. N., Kwaja, Z., Jorgensen, G. E., Pellegata, N. S., Plattner, R., Stanbridge, E. J., and Cajot, J. F. (2000). p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest. *Int J Cancer* 88, 685-91.

Jones, N. (1995). Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 199, 59-80.

Jost, C. A., Marin, M. C., and Kaelin, W. G., Jr. (1997). p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389, 191-4.

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., and Caput, D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809-19.

Kartasheva, N. N., Contente, A., Lenz-Stoppler, C., Roth, J., and Dobbelstein, M. (2002). p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* 21, 4715-27.

Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Arigo, S. M., and Ariga, H. (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem* 275, 10477-83.

Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-72.

Kolli, S., Buchmann, A. M., Williams, J., Weitzman, S., and Thimmapaya, B. (2001). Antisense-mediated depletion of p300 in human cells leads to premature G1 exit and up-regulation of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4646-51.

Krause, K., Haugwitz, U., Wasner, M., Wiedmann, M., Mossner, J., and Engeland, K. (2001). Expression of the cell cycle phosphatase cdc25C is down-regulated by the tumor suppressor protein p53 but not by p73. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 743-50.

Krause, K., Wasner, M., Reinhard, W., Haugwitz, U., Dohna, C. L., Mossner, J., and Engeland, K. (2000). The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B. *Nucleic Acids Res* 28, 4410-8.

Lakin, N. D., and Jackson, S. P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18, 7644-55.

Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-6.

Laronga, C., Yang, H. Y., Neal, C., and Lee, M. H. (2000). Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem* 275, 23106-12.

Leppard, K. N., and Everett, R. D. (1999). The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J Gen Virol* 80, 997-1008.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31.

Li, B., and Lee, M. Y. (2001). Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem* 276, 29729-39.

Li, F., and Altieri, D. C. (1999). Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 344 Pt 2, 305-11.

Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-4.

Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A., and Xiong, Y. (1994). Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9, 2261-8.

Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B., and Levine, A. J. (1994). Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev* 8, 1235-46.

Lin, J., Teresky, A. K., and Levine, A. J. (1995). Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene* 10, 2387-90.

Lipp, M., Schilling, R., and Bernhardt, G. (1989). Trans-activation of human MYC: the second promoter is target for the stimulation by adenovirus E1a proteins. *Oncogene* 4, 535-41.

MacLachlan, T. K., Dash, B. C., Dicker, D. T., and El-Deiry, W. S. (2000). Repression of BRCA1 through a feedback loop involving p53. *J Biol Chem* 275, 31869-75.

Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 391, 601-5.

Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G., and Haber, D. A. (1995). The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* 9, 2143-56.

Manni, I., Mazzaro, G., Gurtner, A., Mantovani, R., Haugwitz, U., Krause, K., Engeland, K., Sacchi, A., Soddu, S., and Piaggio, G. (2001). NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest. *J Biol Chem* 276, 5570-6.

Markey, M. P., Angus, S. P., Strobeck, M. W., Williams, S. L., Gunawardena, R. W., Aronow, B. J., and Knudsen, E. S. (2002). Unbiased analysis of RB-mediated transcriptional repression identifies novel targets and distinctions from E2F action. *Cancer Res* 62, 6587-97.

Martin, D. W., Munoz, R. M., Subler, M. A., and Deb, S. (1993). p53 binds to the TATA-binding protein-TATA complex. *J Biol Chem* 268, 13062-7.

McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c- Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-74.

Michael, D., and Oren, M. (2002). The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12, 53-9.

Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S. F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Nielsen, L. L., Pickett, C. B., and Liu, S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 21, 2613-22.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-805.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-9.

Momand, J., Wu, H. H., and Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242, 15-29.

Muller, H., and Helin, K. (2000). The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1470, M1-12.

Murphy, M., Ahn, J., Walker, K. K., Hoffman, W. H., Evans, R. M., Levine, A. J., and George, D. L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13, 2490-501.

Murphy, M., Hinman, A., and Levine, A. J. (1996). Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule- associated protein. *Genes Dev* 10, 2971-80.

Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.

Nemerow, G. R., and Stewart, P. L. (1999). Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 725-34.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-8.

Park, M., Chae, H. D., Yun, J., Jung, M., Kim, Y. S., Kim, S. H., Han, M. H., and Shin, D. Y. (2000). Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest. *Cancer Res* 60, 542-5.

Perry, M. E., Piette, J., Zawadzki, J. A., Harvey, D., and Levine, A. J. (1993). The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11623-7.

Pilder, S., Moore, M., Logan, J., and Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol* 6, 470-476.

Polager, S., and Ginsberg, D. (2002). E2F mediates sustained G2 arrest and down-regulation of Stathmin and AIM-1 expression in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* 277, 21.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-5.

Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A., and Dynlacht, B. D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 16, 245-56.

Rosahl, T., and Doerfler, W. (1992). Alterations in the levels of expression of specific cellular genes in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virus Res* 26, 71-90.

Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S., and Dobbelstein, M. (1998). Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol* 72, 8510-8516.

Sabbatini, P., Chiou, S. K., Rao, L., and White, E. (1995). Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol Cell Biol* 15, 1060-70.

Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., and Prendergast, G. C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15, 887-98.

Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J., and Levine, A. J. (1982). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28, 387-94.

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-36.

Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-34.

Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J., and Shenk, T. (1992). Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12028-32.

Shen, Y., and Shenk, T. (1994). Relief of p53-mediated transcriptional repression by the adenovirus E1B 19-kDa protein or the cellular Bcl-2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8940-4.

Shenk, T. (1996). Adenoviridae: The viruses and their replication. In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven), pp. 2111-2148.

Sobel, A. (1991). Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci* 16, 301-5.

Stiewe, T., and Putzer, B. M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* 26, 464-9.

Studzinski, G. P., Shankavaram, U. T., Moore, D. C., and Reddy, P. V. (1991). Association of c-myc protein with enzymes of DNA replication in high molecular weight fractions from mammalian cells. *J Cell Physiol* 147, 412-9.

Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58, 5315-20.

Taylor, W. R., and Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-15.

Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E. L., and Lipp, M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev* 3, 527-36.

Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-21.

van Dam, H., Offringa, R., Smits, A. M., Bos, J. L., Jones, N. C., and van der Eb, A. J. (1989). The repression of the growth factor-inducible genes JE, c-myc and stromelysin by adenovirus E1A is mediated by conserved region 1. *Oncogene* 4, 1207-12.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.

Vousden, K. H. (2000). p53. Death star. *Cell* 103, 691-4.

Vousden, K. H. (2002). Switching from life to death: The Miz-ing link between Myc and p53. *Cancer Cell* 2, 351-2.

Vousden, K. H., and Woude, G. F. (2000). The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol* 2, E178-80.

Weinmann, A. S., Yan, P. S., Oberley, M. J., Huang, T. H., and Farnham, P. J. (2002). Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* 16, 235-44.

Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-9.

Wienzek, S., and Dobbelstein, M. (2001). Viral and cellular factors that target the promyelocytic leukemia oncogenic domains strongly activate a glucocorticoid-responsive promoter. *J Virol* 75, 5391-7.

Wunderlich, M., and Berberich, S. J. (2002). Mdm2 inhibition of p53 induces E2F1 transactivation via p21. *Oncogene* 21, 4414-21.

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dotsch, V., Andrews, N. C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2, 305-16.

Yang, A., and McKeon, F. (2000). p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 199-207.

Yang, U. C., Huang, W., and Flint, S. J. (1996). mRNA export correlates with activation of transcription in human subgroup C adenovirus-infected cells. *J Virol* 70, 4071-80.

Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T. P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30, e15.

Yun, J., Chae, H. D., Choy, H. E., Chung, J., Yoo, H. S., Han, M. H., and Shin, D. Y. (1999). p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor. *J Biol Chem* 274, 29677-82.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H., and Levine, A. J. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-93.

10 Danke

Herrn Professor Essen danke ich für die schnelle und unbürokratische Übernahme meiner Betreuung von Seiten der Fakultät für Chemie.

Herrn Professor Klenk danke ich für die Aufnahme in sein Institut und die großzügigen Arbeitsbedingungen.

PD Dr. Matthias Dobbels danke ich sehr herzlich für die großartige Betreuung und permanente Ansprechbarkeit in allen Situationen des wissenschaftlichen Alltages.

Der gesamten Arbeitsgruppe Dobbels danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Ana, Angelika, Christoph und Constanze danke ich für eine sehr entspannte, hilfsbereite, unkomplizierte und fröhliche Arbeitsatmosphäre in G26, sowie (mittlerweile nicht mehr zählbare) gemeinsame Kochabende.

Für eine sehr konstruktives Lektorat von Roh- wie pseudo-Endfassungen möchte ich mich bei Anja Scholzen sehr herzlich bedanken. Und auch für zahlreiche durchquatschte Abende, Aufmunterungsanrufe aus der Ferne und Abende mit Knoblauchpaste.

Petra Schöcker danke ich für ihre Begleitung durch die letzten 10 Jahre, für diverse gemeinsame Kämpfe mit Differenzialgleichungen und Herleitungen, Wasserdampfdestillationen, Auslandsaufenthalten, Abschlusskolloques sowie Vor- und Haupt-Diplom.

Tanja Schreiber danke ich für Lulus, Lachsalven, Beistand in wirklich allen Lebenslagen sowie unendlich viele entspannende Gespräche, Spaziergänge und Telefonate.

Die Praktikantinnen Verena, Beate und Julia haben durch ihr Engagement und ihren Eifer ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Vielen Dank auch an meine WG-Familie Kerstin und Carolin.

Herbert, Marianne und Anna danke ich für die Unterstützung und Ermöglichung meines gesamten Studiums, für ihre Liebe und ihr Verständnis.